

Aus dem II. Anatomischen Institut  
der Freien Universität Berlin  
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN  
BEGINN DER BASALMEMBRAN- UND FIBRILLENBILDUNG IM  
INTERZELLULARRAUM FRÜHER HÜHNEREMBRYONEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ingeborg Klöppel geb. Lanz

aus Danzig

1969



Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Willy S c h w a r z

---

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN  
BEGINN DER BASALMEMBRAN- UND FIBRILLENBILDUNG IM  
INTERZELLULARRAUM FRÜHER HÜHNEREMBRYONEN

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ingeborg Klöppel geb. Lanz

aus Danzig

Dekan: Professor Dr.med. Hans Heinz N a u m a n n

Referent: Privatdozent Dr.med. Hans-Joachim M e r k e r

Korreferent: Professor Dr.med. Willy S c h w a r z



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 4. 2. 1969

|      |                                 |    |
|------|---------------------------------|----|
| I.   | Einleitung . . . . .            | 1  |
| II.  | Material und Methoden . . . . . | 7  |
| III. | Befunde . . . . .               | 8  |
| IV.  | Diskussion . . . . .            | 16 |
| V.   | Zusammenfassung . . . . .       | 23 |
|      | Literaturverzeichnis . . . . .  |    |

## Einleitung

Die Fortschritte auf dem Gebiet der Biochemie haben uns die Kenntnis vermittelt, daß jeder morphologisch faßbaren Differenzierung eine Funktions- und Strukturänderung im chemischen bzw. molekularen Bereich vorausgeht. Die morphologische Darstellung dieser "Chemodifferenzierung" (BRACHET 1960; FLICKINGER 1962; MASSHOFF 1955; SCHIEBLER 1967) ist ein wesentliches Anliegen der elektronenmikroskopisch arbeitenden Embryologen. Lichtmikroskopische Untersuchungen sind zur Überbrückung der Lücke zwischen biochemisch und morphologisch faßbarem Differenzierungsbeginn wegen der geringen Auflösung nicht geeignet. Auch die histochemischen Methoden scheinen noch zu grob und scheitern oft an den quantitativen Problemen der kleinen Objekte. Die elektronenmikroskopische Technik verspricht dagegen auf diesem Gebiet bessere Fortschritte.

Durch die stürmische Entwicklung dieser Methode konnte in den letzten Jahren ein neues Zellbild erarbeitet und die funktionelle Deutung der Feinstrukturen durchgeführt werden (Lit. siehe BARGMANN 1967; MERKER 1964; RUSKA 1961; WOHLFARTH-BOTTERMANN 1963). - Besonders auf dem Gebiet der Bindegewebsforschung gelang es, erstaunliche Einzelheiten darzustellen und strittige Fragen zu klären (Lit. siehe GRASSMANN 1965; HODGE und SCHMITT 1960; SCHMITT und HODGE 1960; SCHWARZ 1957, 1960, 1965). Trotzdem ist wenig über diejenigen Vorgänge und ihre Ursachen bekannt, die zur Umformung undifferenzierter Zellen zu typischen Fibroblasten führen oder die sog. ruhende Bindegewebszellen zur Bildung von Interzellulärsubstanz anregen.

Auch im Laufe der embryonalen Entwicklung müssen von einem bestimmten Zeitpunkt an Zellen entstehen, die typische Zeichen von Bindegewebszellen aufweisen: Sie sind erstens in der Lage, Interzellularsubstanz zu bilden (Fasern und Grundsubstanz) und sind zweitens unfähig, durch direkte Zellkontakte (Adhäsion) zusammenhängende Zellverbände zu bilden (Lit. siehe ABERCROMBIE 1961; SCHWARZ 1965). Die Zellen, die diese Eigenschaften erwerben, sollen nach der klassischen Vorstellung der Embryologie aus undifferenzierten mesenchymalen Zellen hervorgehen. Im Bereich des Rumpfes entsteht die Masse der Mesenchymzellen durch den Zerfall der Ursegmente (Somiten) in Sklerotom und Dermatome sowie durch Zellen, die aus dem Verband des Coelomepithels auswandern (Somatopleura, Splanchnopleura) (BARGMANN 1967; STARK 1955). Es könnten also erst dann Strukturen im Interzellularraum des Bindegewebes sichtbar werden, wenn das Somitenstadium erreicht bzw. durchlaufen oder die Coelomhöhle fertig ausgebildet ist. Diese Vorstellungen können elektronenmikroskopisch mit großer Genauigkeit überprüft werden. Außerdem erlaubt die höhere Auflösung auch eine Bestimmung des Zeitpunktes, an dem zuerst Strukturen im interzellulären Raum auftreten. Dazu ist es notwendig, die Feinstruktur der extrazellulären Elemente im normalen Bindegewebe zu kennen. Die Hauptbestandteile des bindegewebigen Interzellularraumes stellen das Kollagen und die Mukopolysaccharide dar.

Das Kollagen ist ein kompliziert gebautes fibrilläres Protein mit einer typischen Aminosäuresequenz (GRASSMANN 1955, 1965). In Analogie zu anderen proteinsynthetisierenden und

sezernierenden Zellen wird Kollagen an den Ribosomen gebildet und das entstandene Polypeptid in die Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums eingebracht. Von hier wird es entweder direkt durch Öffnung der Hohlräume nach außen abgegeben, oder es geht eine Passage durch den Golgi-Apparat voraus (CARO et al. 1964; CHVAPIE et al. 1968; GOULD 1968; JAMIESON 1967; MERKER 1961; ROHR 1966; ROSS et al. 1964; SCHWARZ et al. 1962; SCHWARZ 1965). Im extrazellulären Raum kommen die Polypeptidketten einzeln, zu zweit, überwiegend aber zu dritt in einer  $\alpha$ -Helix zu einem stäbchenförmigen Makromolekül verschraubt, vor: Dieses Makromolekül mit einer Länge von 2800 Å und einer Breite von 12 Å wird als Tropokollagen bezeichnet. Es ist der eigentliche Baustein für alle höheren Strukturen des Kollagens: Durch geordnete End-zu-End- und Seit-zu-Seitaggregation lagern sich die TC-Moleküle zu Filamenten zusammen, welche schließlich durch weitere Apposition zu Kollagenfibrillen mit typischer Querstreifung heranwachsen. Die endgültige Ausdifferenzierung ist erreicht, wenn eine Bündelung der Fibrillen zu Fasern und eine Ausrichtung der Fasern entsprechend den physikalischen Kräften zu Texturen erfolgt ist (BAILEY 1968; GRASSMANN 1955, 1965; GROSS 1956; HODGE et al. 1960; KÜHN et al. 1959; LOW 1968; RAMACHANDRAN 1963; SCHMITT et al. 1960; TANZER 1965).

In neuerer Zeit konnte gezeigt werden, daß auch die Basalmembran eine größere Menge Hydroxyprolin und damit Kollagen enthält. Diese bindegewebige Verdichtungszone ist also - wofür auch ihre Lokalisation im interzellulären Raum spricht - den bindegewebigen Strukturen zuzurechnen. Es ist deshalb

durchaus berechtigt, Fibrillen (Filamente) und Basalmembran gemeinsam zu besprechen. In der Basalmembran liegt das Kollagen nicht als typisch quergestreifte Fibrillen vor, sondern in Form kleinerer Bruchstücke (möglicherweise Tropokollagenmoleküle), die sich elektronenmikroskopisch als ein Netzwerk feinsten Filamente darstellen lassen (v.BRUCHHAUSEN et al. 1965, 1967; DISCHE 1964; GEKLE et al. 1966; GOODMAN et al. 1955; KRAKOWER et al. 1955; SPEIDEL et al. 1963; THOENES et al. 1967). Die Basalmembranen und der Zeitpunkt ihrer Entstehung in den verschiedenen Geweben sollen eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung und der Wachstumsregulation angrenzender Gewebe spielen. Ihr Fehlen ermöglicht offenbar die induzierende Wechselwirkung auf chemischem Wege zwischen verschiedenen Geweben, wie z.B. zwischen Ektoderm und Mesenchym bzw. Chorda. Nach dem Entstehen der Basalmembran gelingt der Austausch chemischer Informationen nicht mehr mit gleicher Schnelligkeit. Interessant sind Befunde, nach denen offenbar die Basalmembran dann gebildet wird, wenn das zugehörige Gewebe gewisse antigene Eigenschaften entwickelt (MERCER 1961). Der Verlust der Basalmembran beim infiltrativen Wachstum von Malignomen spricht ebenfalls für eine wichtige Rolle dieser Bindegewebslamelle bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung (Lit. siehe v. BRUCHHAUSEN et al. 1967; BUSCH et al. 1968; FREY 1962; GROBSTEIN 1953; MERCER 1961). Zur Prüfung dieser Vorstellung müßte der genaue Zeitpunkt und die Sequenz der Basalmembranentstehung erarbeitet werden, um diese Werte dann mit den entsprechenden biochemischen Befunden und der zeitlichen Folge der Differenzierungsvorgänge vergleichen zu können.

Als Grundlage für alle biochemischen und immunbiologischen Arbeiten über diese Probleme wären solche Untersuchungen zweifellos eine wesentliche Voraussetzung.

Die Darstellung der Interfibrillär- bzw. Kittsubstanz, die den extrazellulären Raum zwischen den Filamenten und Fibrillen ausfüllt, gelingt elektronenmikroskopisch im Schnitt leider noch nicht mit genügender Sicherheit. Aus vergleichenden biochemischen, histochemischen und autoradiographischen Untersuchungen ist aber bekannt, daß an diesen Stellen Mukopolysaccharid-Protein-Komplexe vorkommen, die untereinander vernetzt sind oder zu Fäden von unterschiedlicher Länge polymerisieren. Auch diese Substanzen werden in den Fibroblasten gebildet. Die Synthese des Proteinanteils läuft wieder an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums ab, während im Golgi-Apparat der Glukoseeinbau, die Sulfatierung und die Kopplung an das Protein erfolgen. Von hier aus gelangt das endgültige Sekretionsprodukt zusammen mit dem Kollagen in den extrazellulären Raum (Lit. siehe NEUTRA 1965; PETERSEN et al. 1965). Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Feinstruktur der zuerst auftretenden bindegewebigen Interzellularsubstanzen und ihres Entstehungszeitpunktes müssen zur Deutung der Befunde die bisher erhobenen Befunde berücksichtigt werden: Die interfibrilläre Grundsubstanz ist im Elektronenmikroskop schlecht zu beurteilen, das Kollagen ist dagegen deutlich darzustellen. Es kann jedoch in vielfältigen Erscheinungsformen vorkommen: als Polypeptidkette, als Filament (ohne Querstreifung), als Fibrille stark unterschiedlicher Dicke (mit Querstreifung) und als verflochtenes Netzwerk dünner

Filamente in der Basalmembran (LOW 1968; SCHWARZ 1965). Der Fibroblast, in dem die Synthese von Kollagen und Mukopolysacchariden vor sich geht, ist elektronenmikroskopisch charakterisiert durch eine starke Ausprägung des endoplasmatischen Retikulums mit Ribosomenbesatz (rauhes eR), durch einen großen Golgi-Apparat und durch starke Ausfüllung dieser Organellen mit Sekretionsprodukten (SCHWARZ 1965).

Eingehende elektronenmikroskopische Untersuchungen über die zeitliche Folge der Entstehung von Bindegewebsstrukturen (Filamente/Fibrillen und Basalmembran) in frühen Embryonen von Hühnchen und Säugetieren liegen nach unserer Kenntnis bisher nur von LOW (1967,1968) vor. Dieser Autor geht jedoch nicht auf die Lokalisation und Sequenz der zuerst entstehenden Interzellularstrukturen ein, sondern stellt die verschiedenen Erscheinungsformen des Kollagens während der Fibrillogenese dar: Primärfibrillen (40-45 Å), Mikrofibrillen (40-150 Å), typische Kollagenfibrillen. Auch in der Basalmembran weist er Primärfibrillen nach. Vereinzelte lichtmikroskopische Befunde lassen auch keinen Schluß auf Lokalisation und Sequenz zu. Biochemische Resultate sind wegen quantitativer Probleme nur mit Vorbehalt vergleichend zu verwerten (CHAPVIL et al.1968). In der folgenden Arbeit soll deshalb die Entstehung der Strukturen im Interzellularraum von Hühnerembryonen bis zu einer Bebrütungsdauer von 72 Std elektronenmikroskopisch untersucht werden.

## II Material und Methoden

Die Hühnereier stammen aus einer Zucht, deren gleichmäßige Befruchtungsrate und Verwendbarkeit für die Gewebezucht bereits bekannt ist. Die Hühnerkeimscheiben wurden zunächst ohne Bebrütung und dann in sechsständigen Abständen bis zu einer Bebrütungsdauer von 72 Std gewonnen und in situ fixiert. Die Fixierungslösung bestand aus einer 2%igen Glutaraldehydlösung in einem 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4). Nach der lokalen Eröffnung der Eischale und vorsichtigem Absaugen des Hühnereiweißes mit einer Wasserstrahlpumpe wurde die Fixierungslösung direkt in situ an das Objekt herangebracht. Die Fixierungsdauer betrug  $1\frac{1}{2}$  Stunden. Anschließend wurden die Präparate mit Pufferlösung gewaschen und erneut für eine Stunde mit einer 1%igen  $\text{OsO}_4$ -Lösung in Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4) fixiert. Nach nochmaligem Waschen mit Pufferlösung erfolgte das vorsichtige Herauspräparieren der Keimscheibe mit scharfen flachen Skalpell.

Die Keimscheiben wurden dann in toto in der Acetonreihe entwässert und in Mikropal (Fa.Ferak, Berlin) eingebettet. Die Herstellung der Schnitte erfolgte auf LKB-Ultratomen und Servall-Mikrotomen, die Nachkontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat und Bleiacetat für je 15 Minuten. Für die Aufnahmen verwendeten wir Siemens Elmiskope I und Ia bei einer Primärvergrößerung von 1500 bis 40000 (80 KV, Blenden 200/50  $\mu$ ). Die Beurteilung der Bilder wurde an  $3\frac{1}{2}$ -fachen positiven Nachvergrößerungen auf Papier durchgeführt. Wir benutzten für die

Messungen ein graduiertes Meßokular von Zeiss. Zur Orientierung im Objekt erwies es sich als notwendig, vor Herstellung der Dünnschnitte lichtmikroskopische Schnitte von etwa  $1\text{ }\mu$  Dicke anzufertigen. Die Darstellung der Strukturen am Lichtmikroskop gelang am besten mit einer 1%igen wäßrigen Giemsa-lösung mit Boraxzusatz.

### III Befunde

Die morphologischen Befunde schwanken in den einzelnen Keimscheiben trotz gleicher Bebrütungsdauer, so daß die im folgenden durchgeführte Festlegung auf einen bestimmten Zeitpunkt nur für einen Durchschnittswert gilt. Nach unseren Erfahrungen muß bei Zugrundelegung morphologischer Kriterien in seltenen Fällen mit einer zeitlichen Abweichung bis zu 6 Stunden gerechnet werden. Diese Durchschnittswerte stimmen gut mit den Normentafeln von KEIBEL (1900) sowie HAMBURGER und HAMILTON (1951) überein.

In den ersten drei Fixierungsstadien (0, 6, 12, 18 Stunden) lassen sich im interzellulären Raum elektronenmikroskopisch noch keine Strukturen nachweisen. Nur an sehr wenigen Stellen finden sich kleine Plaques aus elektronendichterem Material, in denen sich jedoch keine granulären oder filamentären Elemente darstellen lassen.

Nach einer Bebrütungsdauer von 24 Stunden werden die ersten Filamente im bindegewebigen Raum sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt finden wir morphologisch ein zweischichtiges Periderm mit

weiten Interzellularräumen, ein einschichtiges Entoderm mit Fetteinschlüssen, eine weitgehend offene Neuralrinne, eine Chorda und mesenchymal angeordnete Mesodermvorstufen zu beiden Seiten der Achse. Eine deutlich abgegrenzte Coelomhöhle ist in diesem Stadium noch nicht vorhanden. In dieser noch flach ausgebreiteten frühembryonalen Anlage treten die ersten elektronenmikroskopisch faßbaren Filamente immer an den gleichen typischen Stellen auf: zwischen Ektoderm und den jetzt noch locker gepackten Zellen der späteren Somiten und um die Chorda. Sie sind etwa 100 - 130 Å dick, zeigen noch keine Querstreifung und verlaufen vorwiegend einzeln und ungeordnet noch ohne eine angedeutete Bündelung. Zwischen ihnen kommt manchmal ein homogenes und nur schwach elektronendichtes Material vor. Die Zone mit unregelmäßig verlaufenden Filamenten unter dem Periderm ist 1 - 4 µ breit und hat offenbar eine besondere topographische Beziehung zu dieser Ektodermschicht. An den Stellen, wo die Zellen des darunterliegenden Mesoderms weit entfernt vom Periderm liegen, bleiben die Filamente immer in der Nähe des ektodermalen Blattes lokalisiert.

Eine zweite, ebenfalls einige Micron breite filamenthaltige Zone umgibt die Chorda. Der Verlauf dieser Filamente ist selektiv unipolar zur Oberfläche der Chorda ausgerichtet. Innerhalb dieser Vorzugsrichtung können die Filamente jedoch völlig ungeordnet verlaufen. Ihre Packungsdichte ist in Chordanähe höher als in einiger Entfernung davon. - In den übrigen Bezirken der 24 Stunden bebrüteten Keimscheibe kommen nur sehr wenige Einzelfilamente vor.

Als weitere elektronenmikroskopisch faßbare Struktur im Interzellularraum tritt an den Keimscheiben dieses Stadiums erstmalig die Basalmembran auf. Ihre Lokalisation stimmt mit dem Verlauf der filamentreichen Zonen überein. So zieht sie einmal als zartes, etwa 200 - 300 Å breites elektronendichtes Band in einem Abstand von 300 Å parallel zu den basalen Zellmembranen des Periderms, also zwischen Periderm und filamentreicher Zone. Bei höherer Vergrößerung läßt sich hier ein vernetztes feinfädiges Material in einer weniger dichten Grundsubstanz nachweisen. Die Dicke dieser nur sehr schwer darstellbaren Filamente beträgt etwa 40 - 60 Å. Zu diesem Zeitpunkt ist die Basalmembran jedoch noch nicht durchgehend ausgebildet, sondern gegen die Neuralrinne und die Peripherie der Keimscheibe stark aufgelockert. Während sie im Bereich der sich später ausbildenden Somiten schon kontinuierlich zur Darstellung kommt, besteht sie in einiger Entfernung davon lediglich aus unscharf begrenzten Plaques des beschriebenen Materials.

Eine weitere Basalmembran findet sich zwischen der Filamentenscheide der Chorda und dem Chordaepithel. Hier ist sie jedoch schon kontinuierlich ausgebildet. Ein Einstrahlen der Filamente aus der umgebenden Zone in die Basalmembran konnte an keiner Stelle beobachtet werden. An wenigen Stellen findet man höchstens eine angedeutete Anlagerung. Um die übrigen epithelial gebauten Zellverbände und um die ersten sich bildenden Kapillaren kommt zu diesem Zeitpunkt noch keine Basalmembranbildung vor.

Nach einer Bebrütungsdauer von 30 Stunden entspricht das Bild von Filamenten und Basalmembranen den Verhältnissen bei 24-stündiger Bebrütung. Die Basalmembran unter dem Periderm hat sich etwas ausgebreitet, also nach zentral und peripher weiter vorgeschoben.

Nach 36-stündiger Bebrütungsdauer läßt sich zum ersten Mal im Bereich der embryonalen Dorsalsegmente der WOLFFsche Gang nachweisen. Beim Hühnchen sind diese Segmente zu diesem Zeitpunkt noch nicht scharf gegen das übrige Gewebe abgegrenzt. Eine Basalmembran läßt sich nicht darstellen. Der Epithelschlauch des WOLFFschen Ganges wächst in den folgenden Stadien caudalwärts vor und wird deshalb von nun an in vielen Schnitten angetroffen. Eine besondere Beziehung zu den Filamenten besteht offenbar nicht. Es findet sich hier niemals eine deutliche Anhäufung von Filamenten, wie z.B. in der Umgebung der Chorda. Dagegen zeigt die Basalmembran während dieses Wachstumsvorganges ein ganz typisches Verhalten: In den cranialen gutgegliederten Abschnitten des WOLFFschen Ganges, die aus regelmäßig angeordneten kubischen Zellen aufgebaut sind, ist sie kontinuierlich vorhanden und zieht als ca. 300 Å dicke Lamelle in einem Abstand von 300 Å parallel zu den basalen Zellmembranen. Caudalwärts lockert sich die Basalmembran auf. Es entstehen immer größere Lücken, die Kontur wird unscharf und schließlich finden sich nur wenige elektronendichte Plaques aus basalmembranähnlichem Material. Am caudalen Pol, dem sog. Wachstumskegel, fehlt die Basalmembran völlig. Dieser Abschnitt des WOLFFschen Ganges besteht aus dichtgepackten

epithelialen Zellen, in deren Zentrum noch kein Lumen nachzuweisen ist und die mit unterschiedlich langen und breiten Fortsätzen in den umgebenden bindegewebigen Raum hineinragen.

Die Neuralrinne hat sich zu diesem Zeitpunkt in den cranialen Abschnitten bereits geschlossen. Nachaem sich schon kurz vor dem Schluß kleine Plaques von elektronendichtem Material der Neuralrinne angelagert haben, beginnt jetzt die Ausbildung einer kontinuierlichen Basalmembran.

Neben den ersten Somiten oder Ursegmenten haben jetzt auch die Coelomhöhlen eine definierbare epitheliale Begrenzung erhalten. Basalmembranähnliche Strukturen sind jedoch um diese epithelialen Zellverbände noch nicht festzustellen. Während der Somit auch in der weiteren Entwicklung niemals eine Basalmembranhülle erhält, entstehen in späteren Stadien solche Verdichtungszone unter dem Coelomepithel. Im gesamten extrazellulären Raum finden wir zu diesem Zeitpunkt nur wenige einzeln liegende Filamente von ca. 100 Å Dicke. In den beschriebenen Filamentzonen unter dem Periderm und um die Chorda haben sowohl die Zahl der Filamente als auch die Dicke der Schicht zugenommen.

Nach 42-stündiger Bebrütungsdauer ist die Zahl, Lokalisation und auch die Feinstruktur der Filamente nicht wesentlich verändert. Auch in diesem Stadium finden sich die filamentreichen Zonen unter dem Periderm und um die Chorda. In den übrigen Bezirken können einzelne Filamente oder kleine Bündel von 3-5 Filamenten mit einer regellosen Verlaufsrichtung angetroffen

werden. Ihre Zahl ist jedoch gering. Kontinuierliche Basalmembranen grenzen die Chorda, die hohlen Teile des WOLFFschen Ganges und das Periderm ab. Große Teile des Neuralrohres und der Coelomhöhlen besitzen abschnittsweise eine Basalmembran, am Epithel des Entoderms fehlt sie noch. Das Vorhandensein oder Fehlen der Basalmembranen an bestimmten Stellen der Coelomhöhlen und des Neuralrohres ist offenbar abhängig von der Wachstumstendenz des benachbarten Epithels. An den Stellen, wo Wachstumsvorgänge, Zellbewegungen und Adhäsionsveränderungen vorkommen, fehlt diese bindegewebige Verdichtungszone (Augenblase, Ganglienzelleiste, Somato- bzw. Splanchnopleura im Bereich der Mesenchymbildung).

In den nächsten Stadien - nach 48, 54 und 60-stündiger Bebrütungsdauer - ändert sich das Bild noch nicht wesentlich. Auch die Feinstruktur der Filamente unterscheidet sich nicht von dem früher beschriebenen Bild. Ihre Dicke beträgt jetzt 120 - 160 Å. Sie verlaufen entweder einzeln regellos oder zu kleinen Fasern gebündelt. Auch hier bei hoher Vergrößerung läßt sich noch keine Querstreifung vom 210 oder 640 Å-Typ nachweisen. An einigen Stellen kann höchstens von einer perl-schnurähnlichen Strukturierung gesprochen werden (beaded filaments). Auf den Bildern dieser Stadien fallen jetzt besonders deutlich die großen Gefäße im Herzbereich ins Auge. Weder um diese noch um die Blutgefäße anderer Lokalisation ist zu diesem Zeitpunkt eine Basalmembran vorhanden.

Nach 66 - 72-stündiger Bebrütungsdauer sieht man eine Vielzahl neuer Gewebe entstehen: Die Hemisphärenbläschen, das Linsen- oder Ohrbläschen, nach Schluß des Entodermrohres die Leber- und Pankreasanlage, die Urnierenanlage und die gerade angedeuteten Extremitätenknospen. Das Periderm, die Chorda sowie große Abschnitte des Neuralrohres und der Gehirnbräschen sind von einer kontinuierlichen Basalmembran umgeben; - im Bereich der Hemisphärenbläschen fehlt sie noch. Im übrigen Schädel, insbesondere am Linsen- und Ohrbläschen sind die Verhältnisse unübersichtlich. Bei ersterem scheint sie zu fehlen, beim letzteren vorhanden zu sein. Diese Unsicherheit resultiert zum großen Teil aus der Notwendigkeit, sehr dünne und kleinflächige Schnitte herzustellen, so daß die Bestimmung der Lage und Schnittrichtung äußerst schwierig ist. .

Im Bereich des Coelomepithels ist die Ausbildung der Basalmembran sehr wechselhaft. In den lateralen Bereichen ist sie nur streckenweise vorhanden. Um die epithelialen Strukturen der Nierenanlagen des medialen Bereiches scheint sie nach den vorliegenden Befunden wieder vollständig vorhanden zu sein. Auch der Darm wird jetzt auf weiten Strecken von einer Basalmembran umgeben. Im Bereich der Knospungsvorgänge (Leber, Pankreas) fehlt sie allerdings wieder. Die Gefäße der Herzanlage beginnen dagegen eine Basalmembranabgrenzung auszubilden. Filamentreiche Bezirke sind auch jetzt noch unter der Basalmembran des Periderms und der Chorda nachzuweisen. Darüber hinaus finden wir eine Anhäufung von Filamenten überall dort,

wo sich inzwischen eine kontinuierliche Basalmembran ausgebildet hat. Daneben lassen sich natürlich die bereits beschriebenen Einzelfilamente und kleinen isolierten Filamentbündel in den übrigen Bezirken nachweisen. Ihre Ultrastruktur hat sich nicht verändert. Interessanterweise ist an den Stellen, wo später kollagenes Bindegewebe gefunden wird (z.B. Extremitätenanlage und späterer Wirbelsäulenbereich), zu diesem Zeitpunkt erst ein epitheloid gepacktes Blastem vorhanden, das noch keine zwischenzelligen Strukturen enthält.

In allen Stadien finden sich Zellen, die ein vorwiegend flaches Hohlraumsystem mit Membranbegrenzung und aufsitzenden Ribosomen enthalten (rauhes endoplasmatisches Retikulum). Selbst in sehr frühen Stadien, z.B. nach 24 Std Bebrütung, kommen in dem noch mesenchymal angeordneten Zellverband der Somitenanlage und im Periderm bereits einzelne Zellen vor, die dieses rauhe endoplasmatische Retikulum besitzen. Das Chordaepithel ist sogar durch die starke Ausprägung dieses Zellorganells charakterisiert. Wenn dann die mesodermalen Hohlraumstrukturen geformt sind (Somit, Coelomhöhle) oder schon Zellen entlassen, überwiegen dagegen im mesenchymalen Verband solche Zellen.

#### IV Diskussion

Aus diesen Befunden geht hervor, daß im interzellulären Raum des Hühnchenembryos unerwartet früh filamentäre Strukturen und Basalmembranen auftreten. Die chemische Natur dieser Strukturen ist allein morphologisch nicht zu bestimmen. Der Gedanke liegt jedoch nahe, daß es sich um Kollagen handelt. Untersuchungen an anderen Fibrillogenese-Modellen sowie Versuche über Auflösung und Wiederaufbau von Fibrillen im Reagenzglas haben gezeigt, daß die typische kollagene Fibrille aus filamentären Vorstufen ohne elektronenmikroskopisch sichtbare Querstreifung hervorgeht. Das Fehlen der Querstreifung in den Vorstufen beruht höchstwahrscheinlich auf der noch zu geringen Ordnung der Polypeptidketten im Filament und sicher auf der zu geringen Menge an mit den üblichen Kontrastierungsmitteln reagierenden Gruppen (GROSS 1956; HAUST 1965; HODGE et al. 1960; LOW 1966, 1967, 1968; SCHMITT et al. 1960; SCHWARZ 1965; WASSERMANN 1956). In Analogie zu diesen Befunden dürfen wir darauf schließen, daß es sich bei den von uns beobachteten Filamenten im Interzellularraum um Kollagenstrukturen handelt. Für diese Vorstellung spricht auch das gleichzeitige Auftreten von Basalmembranen und Filamenten. Die Basalmembranen enthalten nach Untersuchungen von BONTING et al. (1961), v. BRUCHHAUSEN et al. (1965, 1967), DISCHE (1964), GOODMAN et al. (1955), KEPHALIDES (1966) und SPEIDEL et al. (1963) ebenfalls einen beträchtlichen Anteil an Kollagen. Wenn also diese frühembryonalen Basalmembranen und Filamente den entsprechenden Strukturen im erwachsenen Organismus gleichzusetzen sind und kollagene

Protein enthalten, erhebt sich die Frage, welche Zellen zu diesem frühen Zeitpunkt für eine Kollagensynthese in Frage kommen. Fibroblasten, die als Abkömmlinge des Mesenchyms angesehen werden müssen, sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu erwarten. Die mesodermale Anlage besteht nach 24-stündiger Bebrütungsdauer lediglich aus locker aggregierten Zellen zwischen Ekto- und Entoderm zu beiden Seiten der Chorda. Weder Ursegmente noch Coelomhöhlen, aus denen im Rumpfbereich nach der klassischen Vorstellung das Mesenchym durch Zellabwanderung hervorgeht, sind vorhanden. Es muß also angenommen werden, daß auch andere Zellen, wenigstens vorübergehernd, Mesenchymfunktion im Sinne einer Interzellulärsubstanzbildung übernehmen können. Sie müssen in Analogie zu anderen Eiweiß- und Mucin-bildenden und sezernierenden Zellen ein spezifisches Enzym- und Organellensystem entwickeln. Dieses besteht u.a. aus endoplasmatischen Hohlräumen mit Ribosomenbesatz (rauhes eR).

Die Masse der Zellen zwischen den beiden Keimblättern zu beiden Seiten der Chorda enthalten keine ausgeprägten Hohlräume des rauhen eR. In ihnen kommen dagegen die Ribosomen als sog. "freie Ribosomen" vor, die neben wenigen Mitochondrien den ganzen Zelleib ausfüllen. Sie bieten damit das typische Bild der "retaining cells" nach BIRBECK u. MERCER (1961). Diese Zellen kommen also für eine Kollagen- und Mukopolysaccharidsynthese nicht in Betracht. Das in ihnen gebildete Eiweiß ist für den Eigenbedarf bestimmt. Daneben finden sich aber einzelne Zellen, deren Cytoplasma die

beschriebenen endoplasmatischen Membranen mit Ribosomenbesatz aufweist. Aus ihrer morphologischen Ähnlichkeit mit den Fibroblasten späterer Stadien kann man mit großer Wahrscheinlichkeit darauf schließen, daß in ihnen die Synthese und Sekretion der frühembryonalen kollagenen Interzellulärsubstanz vor sich geht. Die Morphologie dieser Fibroblasten-ähnlichen Zellen und die Vorgänge im extrazellulären Raum während der Fibrillogenese entsprechen völlig dem morphologischen Substrat der Fibrillogenese im späteren Embryonalstadium (MERKER 1961), bei der Wundheilung (MERKER 1961) und in der Gewebekultur (SCHWARZ et al. 1962; SCHWARZ 1965). Es treten zuerst neben den Zellen, die reichlich rauhes endoplasmatisches Material enthalten, elektronendichtere Plaques auf, ohne besondere Strukturierung. Dann lassen sich regellos verlaufende feine Filamente darstellen, die an Dicke zunehmen, sich teilweise bündeln und schließlich zu typischen quergestreiften Fibrillen werden. Das Fibrillenstadium wird jedoch in den untersuchten frühen embryonalen Stadien des Hühnchens nicht erreicht. Wir müssen aus diesen Befunden schließen, daß bereits vor der Entstehung des Mesenchyms aus dem Mesoderm Zellen aus den Keimblättern für die Synthese von Interzellulärsubstanz herangezogen werden. Ihre Zahl ist zwar gering, so daß sie lichtmikroskopisch schwer zu erfassen sind, doch sind sie elektronenmikroskopisch nachzuweisen und müssen von der Funktion her als zusammengehörig betrachtet werden.

Es muß aber außerdem noch erwähnt werden, daß einzelne Autoren auch den epithelialen Zellverbänden die Fähigkeit zur Kollagensynthese zuschreiben (HAY et al. 1963; LOW 1968; PIERCE 1964, 1966; PIERCE et al. 1963). Auch wir fanden in einzelnen Zellen des Periderms und ausgeprägt im Chordaepithel endoplasmatische Hohlräume mit Ribosomenbesatz. Es wäre also durchaus möglich, daß auch epitheliale Zellen in diesen frühen Stadien in der Lage sind, Kollagen und Mukopolysaccharid-Proteinverbindungen zu bilden. Dazu müßte die allzu starre Einteilung und funktionelle Separation der Keimblätter revidiert werden. Diese Vorstellung fällt nach den neuen Kenntnissen der Biochemie über aktivierbare und inaktive Chromosomenabschnitte nicht mehr so schwer, wie noch vor kurzer Zeit. - Zweifellos muß aber den Epithelzellen des Periderms und der Chorda mindestens eine Mukopolysaccharid-Proteinsynthese zugebilligt werden. Diese Substanzen können dann sowohl zum Aufbau der Basalmembranmatrix als auch für den extrazellulären Mantel der Zelle ("surface coat") genutzt werden (MERKER 1964; FAWCETT 1958).

Bei allen bisher untersuchten Hühnerembryonen traten nach 24-stündiger Bebrütungsdauer die ersten Filamente immer an der gleichen Stelle auf: unter dem Ektoderm lateral von der Neuralrinne und um die Chorda. Um diese typische Lokalisation funktionell und ursächlich deuten zu können, ist es notwendig, die bisher zu dem Lokalisationsproblem veröffentlichten Meinungen zu diskutieren. Es wurden im wesentlichen chemische und physikalische Ursachen zur Erklärung der Lokalisation und Ausrichtung

der Fibrillen herangezogen. K.MEYER (1960) vermutete, daß die Mukopolysaccharide durch eine bestimmte Ordnung reaktiver Gruppen im Verlaufe ihrer polymeren Ketten als Matrizzen auf die Kollagenaggregation wirken. Aus den Untersuchungen in vitro von P.WEISS (1929), der mit definierten Zugspannungen in Gewebekulturen arbeitete, geht hervor, daß physikalische Kräfte die Fibrillenbildung stimulieren und ihre Ausrichtung prägen. In diesem Sinne lassen sich auch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von SCHWARZ (1955<sup>a,b</sup>; 1957,1958,1960,1965) und Mitarbeitern (1958,1962) deuten. Sie fanden eine direkte Abhängigkeit der Fibrillendicke und -ordnung von der einwirkenden Belastung. Beide Ansichten brauchen sich jedoch keineswegs auszuschließen, da physikalische Kräfte stoffwechselerändernd wirken können. Erwähnt sei noch die Ansicht von GODMAN und PORTER (1960), die eine enge Beziehung von Zellmembran und Fibrillenentstehung bzw. Fibrillenrichtung in der Fibroblastenkultur nachweisen konnten.

Beim Hühnerembryo in diesen frühen Stadien können zur Erklärung der Filamentlokalisation physikalische Kräfte mit einiger Sicherheit nur im Bereich der Chorda angenommen werden. Bereits zu diesem Zeitpunkt entstehen in den Chordazellen vorwiegend runde organellenfreie Bezirke, die feingranuläres Material enthalten. Nach Untersuchungen von SCHWARZ (1961) an der Chorda von *Petromyzon fluviatilis* (Flußneunauge) handelt es sich dabei um zuckerähnliche Stoffe mit osmotischen Eigenschaften. Durch die einströmende Flüssigkeit wird der Innendruck der Chordazellen und damit des ganzen Chordastabes

erhöht. Die Folge ist eine Druck- und Zugbelastung des benachbarten Gewebes. Ähnliche Vorgänge lassen sich aufgrund der elektronenmikroskopischen Befunde auch an der Chorda des Hühnerembryos vermuten. So ließe sich hier die Ausbildung einer festen Chordascheide mit physikalischen Gründen erklären.

Schwieriger ist die Deutung der Filamentlokalisation unterhalb des Ektoderms. Ob hier eine Anhäufung von Bildungszellen des Kollagens, chemische Bedingungen oder physikalische Kräfte (oberflächliche Lage des Keims unter der Luftblase und Eiro-tation) eine ausschlaggebende Rolle spielen, kann allein morphologisch nicht entschieden werden. Es wäre bei der Diskussion dieser Probleme auch daran zu denken, ob die Reihenfolge der Entstehung und auch die Lokalisation von Filamenten genetisch verankert sind. Filamente unter dem Ektoderm und um die Chorda verstünden sich dann als Reste eines entwicklungsgeschichtlich weit zurückliegenden Stützmechanismus. Diese Vorstellung klingt auch bei LOW (1968) an. Zweifellos lassen sich aber physikalische Kräfte nicht in gleichem Maße zur Erklärung der Basalmembranbildung heranziehen, wie z.B. bei den Vorgängen während der Filamentbildung um die Chorda.

Eine sehr enge Korrelation besteht hier dagegen zwischen Differenzierungshöhe oder Wachstumsaktivität und Basalmembranbildung. Überall dort, wo ein Epithelverband die endgültige Form erhalten hat und nur noch proportional zu seinen Teilen und zum Gesamtorganismus wächst, bildet sich als Grenze zum Bindegewebe hin eine Basalmembran aus. Meistens ist zu diesem

Zeitpunkt auch eine gewisse Differenzierungshöhe erreicht, z.B. am WOLFFschen Gang mit der Ausbildung eines einschichtigen Epithelverbandes, dessen Zellen durch besondere Kontakte untereinander verbunden sind. - An den Stellen jedoch, wo Epithelverbände sich noch neu formieren (Leber- und Pankreasanlage), wo sie unproportional stark wachsen (Wachstumsspitze des WOLFFschen Ganges, Hemisphärenbläschen, Augenfortsatz) und wo schließlich noch Zellen aus dem Epithelverband entlassen werden (Somit, Coelomepithel), bilden sich keine Basalmembranen. Dieses Verhalten der Basalmembranen gibt den Autoren recht, die eine Aufgabe dieser bindegewebigen Verdichtungszone in einem Verhindern eines autonomen Wachstums sehen (BUSCH et al. 1968; FREY 1962; MERCER 1961). Voraussetzung dafür ist zweifellos eine bestimmte Differenzierungshöhe und Organisation von Epithel und angrenzendem Bindegewebe. Damit wäre die Basalmembran das morphologisch sichtbare Zeichen von Organisations- und Differenzierungsvorgängen, die sich im chemisch-molekularen Bereich abspielen. Vielleicht übt die Basalmembran aber auch noch, ähnlich wie die Filamente und Fibrillen, eine Stützfunktion aus. Die Vorstellung von der Basalmembran als Mikroskelett ist besonders bei den Kapillaren diskutiert worden (CHAMBERS et al. 1947; WOLFF 1962). Für eine Stützfunktion spricht der Zeitpunkt der Basalmembranbildung um die großen Gefäße, der mit dem Beginn von Kontraktionsbewegungen und damit mit der Ausbildung einer Druckwelle zusammenfällt.

## V Zusammenfassung

Hühnerkeimscheiben wurden nach 6-stündigen Abständen bis zu einer Bebrütungsdauer von 72 Stunden elektronenmikroskopisch untersucht. Nach 24 Stunden Bebrütungsdauer lassen sich die ersten Strukturen im Interzellularraum nachweisen. Es handelt sich um Filamente und basalmembranähnliche Verdichtungen unter dem Ektoderm zu beiden Seiten der Neuralrinne und um die Chorda. Die Ausdehnung der Basalmembran unter dem Ektoderm nimmt mit zunehmender Bebrütungsdauer ebenso zu, wie die Anzahl der Filamente. Der WOLFFsche Gang, das Neuralrohr, das geschlossene Entodermrohr und die Coelomhöhle erhalten in den fertig ausgebildeten Abschnitten eine Basalmembranumhüllung. Die Hülle fehlt jedoch überall dort, wo noch Wachstumsvorgänge ablaufen (Telencephalon und Augenbläschen, Wachstumsteil des WOLFFschen Ganges, Leber- und Pankreasknospe) oder wo noch Zellen auswandern (Coelomepithel Splanchno- und Somatopleura). Nach 66 Stunden Bebrütung werden Basalmembranen auch um größere Gefäße und um die jetzt entstehenden epithelialen Organe (z.B. Nierenanlage) sichtbar. Im Interzellularraum finden sich locker verteilt zahlreiche Filamente von ca. 120-160 Å Dicke, die keine Querstreifung zeigen. Aufgrund biochemischer Untersuchungen und morphologischer Ähnlichkeit wird die Kollagennatur dieser Filamente und ein Kollagengehalt der Basalmembranen angenommen.

In Analogie zu Bildungsvorgängen im Bindegewebe muß das Material für die Filamente und Basalmembranen in ortsständigen

Zellen gebildet werden. Solche fibroblastenähnlichen Zellen lassen sich elektronenmikroskopisch nachweisen: 1. in lockeren mesenchymalen Zellverbänden, 2. vereinzelt im Periderm und 3. im Chordaepithel. Die Bildung der Interzellulärsubstanz kommt also im Rumpfbereich vor der Entstehung typischen Mesenchymgewebes aus dem Mesoderm in Gang. Die Bedeutung physikalischer, chemischer und genetischer Faktoren für die Lokalisation und zeitliche Folge des Auftretens von Filamenten und Basalmembranen wird diskutiert.

# L i t e r a t u r

- ABERCROMBIE, M.: The basis of the locomotory behaviour of fibroblasts. Exp.Cell Res. Suppl. 8, 188-198 (1961)
- BARGMANN, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 6. Aufl. G.Thieme Verl. Stuttgart 1967
- BAILEY, A.J.: Effect of conizing radiation on connective tissue components. In: Intern. Rev.of Connective Tissue Res., ed. by D.A.HALL Vol.4 Acad.Press New York-London- 1968, S.233-282
- BIRBECK, M.C. and E.H.MERCER : Cytology of cells which synthesize Protein. Nature 189, 558 (1961)
- BONTING, C.L. De BRUIN, H. and V.E.POLLACK : Quantitative histochemistry of the nephron. IV. Hydroxyproline in the human glomerulum. J.clin.Invest. 40, 177-180 (1961)
- BRACHET, I.: The Biochemistry of Development. Pergamon Press, London-Oxford-New York 1960
- v.BRUCHHAUSEN, F.: Gewinnung und morphologische Charakterisierung einer Basalmembranfraktion aus der Nierenrinde der Ratte. Naunyn-Schm.Arch. 251, 1-12 (1965)
- v.BRUCHHAUSEN, F.: Morphologischer und chemischer Aufbau isolierter Basalmembranen aus der Nierenrinde der Ratte. Histochemie 8, 90-108 (1967)
- BUSCH, W. and H.J.MERKER : Elektronenmikroskopische Untersuchungen an menschlichen Mammacarcinomen. Virch.Arch. 334, 356-371 (1968)
- CARO, L.G. and G.E.PALADE : Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell. Autoradiographic study. J.Cell Biol. 20, 473 (1964)
- CHAMBERS, R. and B.W.ZWEIFACH : Intercellular cement and capillary permeability. Phys.Rev. 27, 431-463 (1947)
- CHVAPIL, M. and J.HURYCH : Control of Collagen Biosynthesis. In: Internat.Rev.connective tissue Res., ed. by D.A. HALL, Vol. 4, 68-196 (1968)
- DISCHE, Z.: Glycans of the less capule - a model of basement membranes. In: Small vessel involvement in Diabetis mellitus, ed.by Md.PIPERSTEIN u.a. Am.Inst.Biol.Sci.Washington 1964
- DISCHE, R.M. FAPPAS, G.D. GRAVER, A. and Z.DISCHE : The carbohydrate of basement membranes of human kidney glomeruli. Biochem.Biophys.Res.Comm. 20, 63-70 (1965)

- FAWCETT, D.W.: Structural specialization of the cell surface. In: *Frontiers of Cytology*, ed. by PALAY, Yale Univ. Press New Haven 1958, pp 19-41
- FLICKINGER, R.A.: Sequential gene action in protein synthesis and cellular differentiation. *Internat. Rev. Cytol.* 13, 75-98 (1962)
- FREI, J.V.: The fine structure of the basement membrane in epidermal tumors. *J. Cell Biol.* 15, 335-342 (1962)
- GEKLE, D. und H.J. MERKER: Neue Vorstellungen über Struktur und Funktion der glomerulären Basalmembran der Niere *Klin. Wschr.* 44, 1217-1224 (1966)
- GODMAN, G.C. and K.R. PORTER: Chondrogenesis, studied with the electron microscope. *J. biophys. biochem. Cytol.* 8, 719-760 (1960)
- GOODMAN, M.; S.A. GREENSPON and C.A. KRAKOWER: The antigenic composition of the various anatomic structures of the canine kidney. *J. Immunol.* 75, 96-104 (1955)
- GOULD, B.S.: Collagen biosynthesis at the ribosomal level. In: *Internat. Rev. conn. tissue Res.* Ed. by D.A. HALL. Acad. Press New York-London Vol. 4, 35-67 (1968)
- GRASSMANN, W.: Unsere heutige Kenntnis vom Kollagen. *Leder* 6, 241-261 (1955)
- GRASSMANN, W.; J. ENGEL; K. HENNIG; H. HÖRMANN and K. KÜHN und A. NORDWIG: *York 1965*
- Kollagen. In: *Fortschritte der Chemie org. Naturstoffe*, hrsg. v. L. ZECHMEISTER, Bd. XXIII, S. 195-314, Springer-Verl. Wien-New York 1965
- GROBSTEIN, C.: Epitheliomesenchymal specificity in the morphogenesis of mouse submandibular rudiments "in vitro". *J. exp. Zool.* 124, 383-414 (1953)
- GROSS, J.: The behavior of collagen units as a model in morphogenesis. *J. biophys. biochem. Cytol.* 2 (Suppl.) 261-274 (1956)
- HAMBURGER, V. and H.L. HAMILTON: Series of normal stages in the development of the chick. *J. Morphol.* 88, 49-92 (1951)
- HAUST, M.D.: Fine fibrils of the extracellular space (Microfibrils): Their structure and role in connective tissue organisation. *Am. J. Pathol.* 47, 1113-1137 (1963)
- HAY, E.D. and J.P. REVEL: Autoradiographic studies of the origin of the basement lamella in amblystoma. *Develop. Biol.* 7, 152- (1963)

- HODGE, A.J. and F.O.SCHMITT : The charge profile of the tropocollagen macromolecule and the packing arrangement in native-type collagen fibrils. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 46, 186-197 (1960)
- JAMIESON, J.D. and G.E.PALADE : Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell I. und II. *J.Cell Biol.* 34, 597 (1967)
- KEFALIDES, N.A.: Isolation and characterization of alveolar basement membran *Clin.Res.* 14, 444 (1966)
- KEIBEL, F. und K.ABRAHAM : Normentafel zur Entwicklungsgeschichte des Huhnes (*gallus domesticus*) G.Fischer-Verl. Jena 1900
- KRAKOWER, C.A. and S.A.GREENSPON : Antigenic composition of various anatomic structures of canine kidney. *J.Immunol.* 75, 96-104 (1955)
- KÜHN, K.; W.GRASSMANN and U.HOFMANN : Über die Bildung der Kollagenfibrillen aus gelöstem Kollagen und die Funktion der kohlehydrathaltigen Begleitkomponenten. *Naturforsch.* 14 b, 436-443 (1959)
- LOW, F.N.: Extracellular connective tissue fibrils in the chick embryo. *Anat.Rec.* 160, 93-107 (1968)
- LOW, F.N.: The fine structure of developing boundary membranes in the early chick embryo. *J.Cell Biol.* 31, 70 A (1966)
- LOW, F.N.: The fine structure of extracellular connective tissue fibrils in the early chick embryo. *Anat.Rec.* 157, 280 (A), (1967)
- LOW, F.N.: Developing boundary (basement) membranes in the chick embryo. *Anat.Rec.* 159, 231 - 238 (1967)
- MASSHOF, W.: Die physiologische Regeneration. In : *Hdb. d.allg.Pathol. Entwickl.u.Wachstum*, Bd 6/I. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, S.441-504
- MERCER, E.H.: Keratin and Keratinization. Pergamon Press Oxford-London-New York-Paris, 1961
- MERKER, H.J.: Über den Aufbau der Zellmembran. *Berl.Med.* 15, 599-607 (1964)
- MERKER, H.J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese im menschlichen Granulationsgewebe. *Langenbecks Arch.klin. Chirurgie* 297, 411-423 (1961)

- MERKER, H.J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in der Haut menschlicher Embryonen. Z.Zellforsch. 53, 411-430 (1961)
- MERKER, H.J.: Die Veränderungen der Rattenvagina im Zyklus und unter experimentellen Bedingungen. Habilitationsschrift, F.U.Berlin 1964
- MEYER, K.: Struktur und Biologie der Polysaccharidsulfate im Bindegewebe. In: Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes, hrsg. v. HAUSS u. LOSSE. G.Thieme-Verlag, Stuttgart 1960, 12-19
- PIERCE, G.B.: The epithelial origin of basement membrans. J.Cell Biol. 23, 74 (Abstract) 1964
- PIERCE, G.B.: The development of basement membranes of the mouse embryos. Develop.Biol. 13, 231-249 (1966)
- PIERCE, G.B.; A.R.MIDGLEY and J. SRI RAM: The histogenesis of basement membranes. J.exp.Med. 117, 339-348 (1963)
- NEUTRA, M.: Radioautographic comparison of uptake of galactose -H<sup>3</sup> and glucose H<sup>3</sup> in the Golgi-region of various cell secreting glycoproteins or mucopolysaccharides. J.Cell Biol. 30, 137-150 (1966)
- PETERSON, M.R. and C.P.LEBLOND: Uptake by the golgi-region of glucose labeled with tritium in the 1 or 6 position, as an indicator of synthesis of complex carbohydrates. Exp.Cell Res. 34, 420-423 (1964)
- ROHR, H.: Die Kollagensynthese in ihrer Beziehung zur submikroskopischen Struktur der Osteoblasten (elektronenmikroskopisch-autoradiographische Untersuchungen mit tritiummarkiertem Prolin). Virch.Arch.path.Anat.338, 342-354 (1965)
- ROSS, R. and R.P.BENDITT: Wound healing and collagen formation. J.Cell Biol. 22, 365-389 (1964)
- RUSKA, H.: Struktur und Funktion der Zelle. Dt.med.J. 12, 711-714 (1961)
- SCHIEBLER, F.: Persönliche Mitteilungen an Dr.MERKER.
- SCHMITT, F.O. and A.J.HODGE: Das Tropokollagen-Makromolekül und die Eigenschaften seiner geordneten Aggregationsform. Leder 11, 74-91 (1960)
- SCHWARZ, W.: Fibrillogenese und Bildung der elastischen Fasern. Arch.Biol. (Liège) 75, 369-370 (1965)

- SCHWARZ, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Chorda-Zellen von Petromyzon. Z.Zellforsch. 55, 597-609 (1961)
- SCHWARZ, W. Die Zwischensubstanz des Bindegewebes. In: Kapillaren und Interstitium (hrsg.von BARTELHEIMER u. KÜCHMEISTER), G.Thieme-Verlag Stuttgart, 1955, S.29-40
- SCHWARZ, W.: Morphology and differentiation of connective tissue fibres. In: Connective tissue, a Sympos. by CIOMS, Blackwell Sci., Publ. Oxford, 1957, pp.144-156
- SCHWARZ, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Sehnenfibrillen verschiedener Säugetiere. Z.Zellforsch. 48, 309-323 (1958)
- SCHWARZ, W.: Heutige Vorstellungen über die ultramikroskopische Struktur des Bindegewebes. In: Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes, hrsg. v.HAUSS u. LOSSE, G.Thieme-Verlag Stuttgart, 1960, 106-130
- SCHWARZ, W.  
H.J.MERKER  
A.JAHNKE und  
M.HOFMANN : Wachstum und Altern des Bindegewebes. Berliner Medizin. Sonderheft 10 Jahre F.U. 1958, 88-90
- SCHWARZ, W.  
H.J.MERKER und  
A.KUTZSCHE : Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in Fibroblastenkulturen. Z.Zellforsch. 56, 107-124 (1962)
- SPEIDEL, E. und  
A.LAZAROW Chemical composition of glomerular basement membrane material diabetes. Diabetes 12, 355 (1963)
- STARK, D.: Embryologie. G.Thieme-Verlag Stuttgart 1955
- TANZER, M.L.: Experimental Lathyrism. Internat.Res.Conn.Tissue Res. 2, 33-100 (1965)
- THOENES, W.: Endoplasmatisches Retikulum und Sekretkörper im Glomerulumepithel der Säugerniere. Ein morphologischer Beitrag zum Problem der Basalmembranbildung. Z.Zellforsch. 78, 561-582 (1967)
- WASSERMANN, F.: The intercellular components of connective tissue: Origin, structure and interrelationship of fibers and ground substance. Erg.Anat.u.Entw.Gesch. 35, 240-333 (1956)
- WEISS, P. Erzwingung elementarer Strukturverschiedenheiten am in vitro wachsenden Gewebe. ROUX' Arch. 116, 438-554 (1929)

WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E.: Grundelemente der Zellstruktur.  
Naturwissenschaften 50, 237-248 (1963)

WOLFF, J.: Neuere Vorstellungen über die Feinstruktur  
der Kapillarwand und ihre funktionelle Deutung. Berl.Medizin 13, 19-32 (1962)

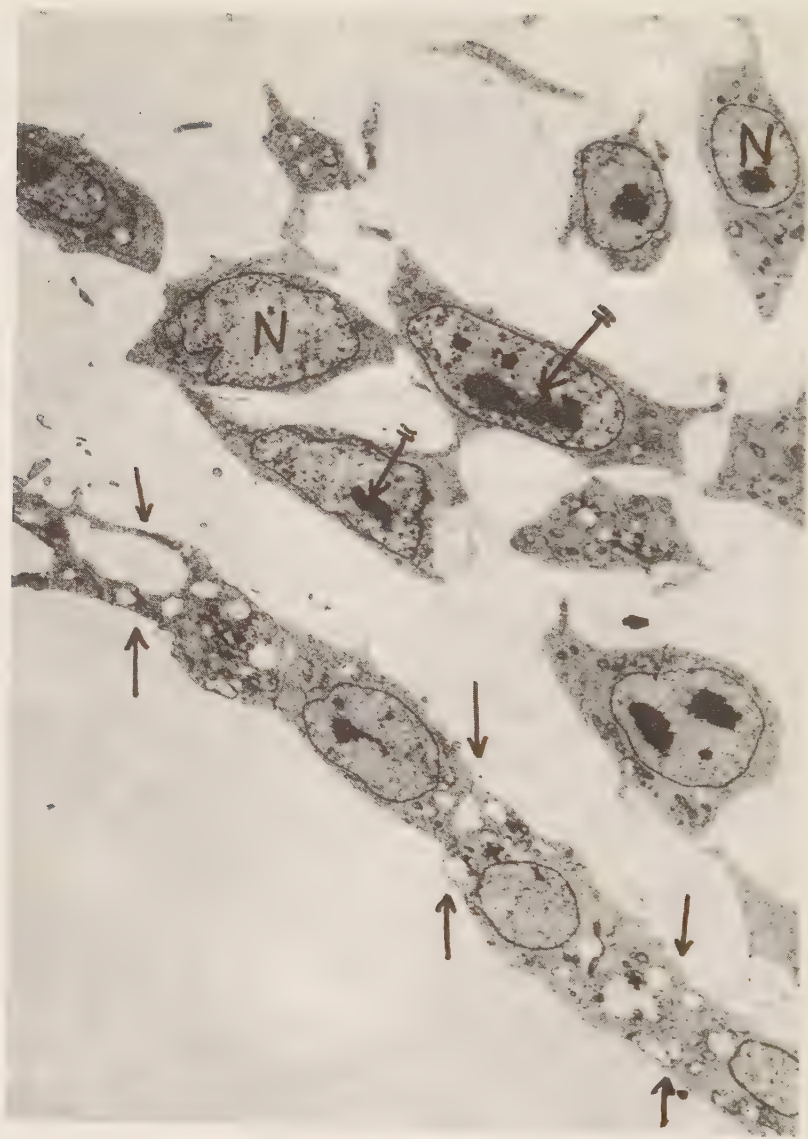


Abb. 1

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 24 Std. Einschichtiges Entoderm (↓) mit Vakuolen und Fetteinschlüssen (X). Noch keine Basalmembran darstellbar. Im oberen Bildteil ein mesenchymaler Zellverband mit großen Kernen (N) und großen, z.T. aufgelockerten Nukleoli (↓). Im Interzellularraum keine Strukturen sichtbar.

Vergrößerung 1 : 7000

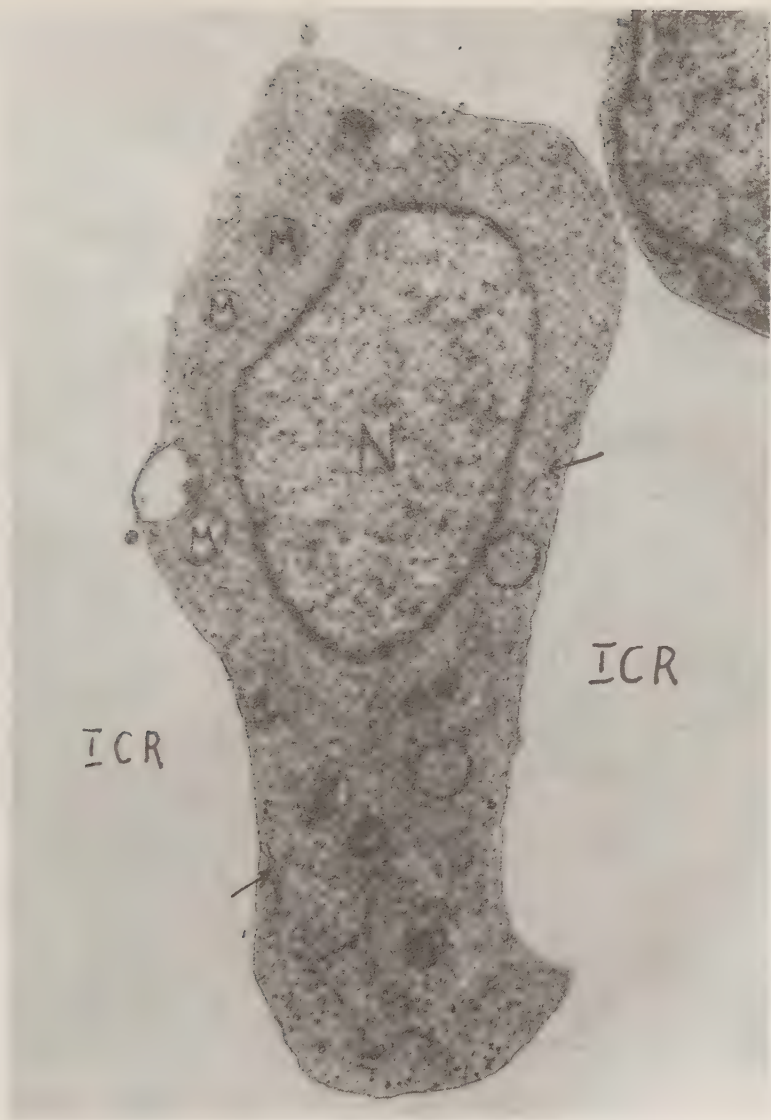


Abb. 2

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 24 Std. Eine Zelle aus dem prämesodermalen lockeren Zellverband in Chordanähe. O = zahlreiche freie Ribosomen zu Gruppen geordnet, ↓ = Hohlräume des eR, N = Nukleus, M = Mitochondrien. Im Interzellularraum (ICR) noch keine Strukturen. Vergrößerung 1 : 21000

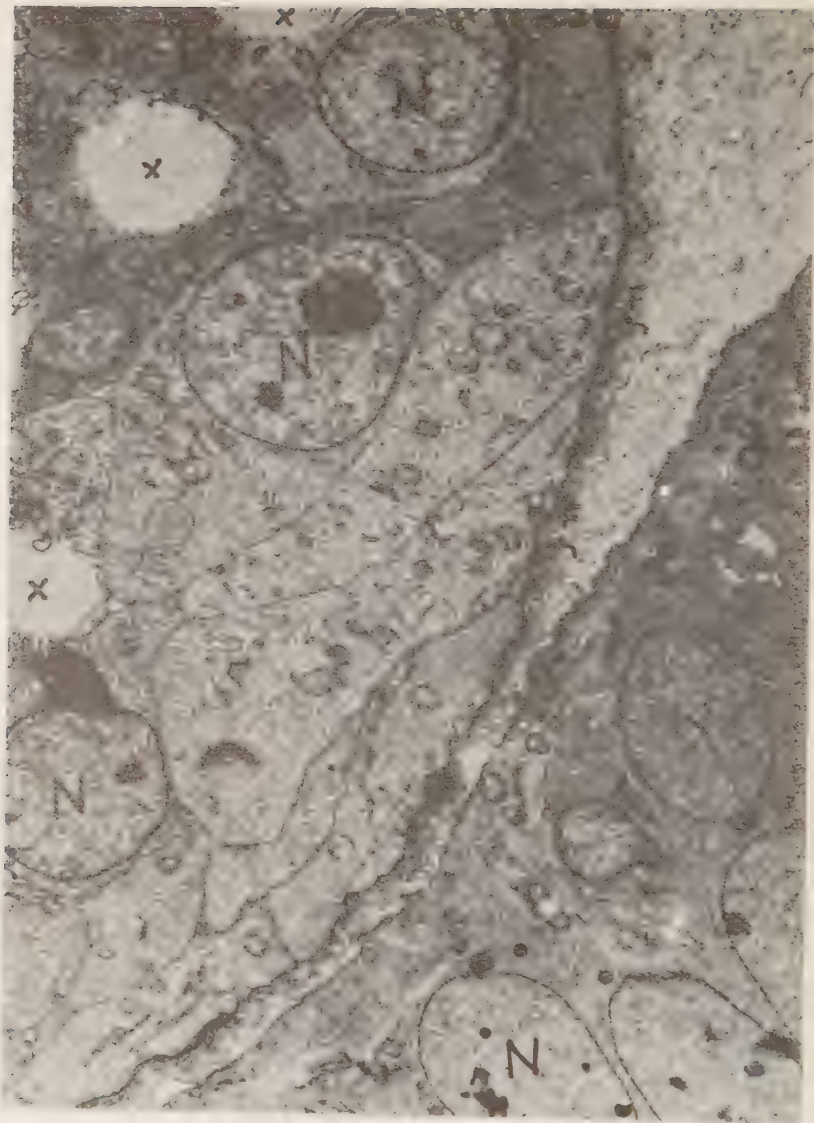


Abb. 3

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 30 Std. Teile der Chorda (links oben) und des Neuralrohres (rechts unten). Um die Chorda eine kontinuierliche Basalmembran und eine etwa 2  $\mu$  breite filamentreiche Zone (F). am Neurallepitheel Beginn einer Basalmembranbildung. Im Chordaepithel Hohlraumbildungen (X). N = Nukleus.

Vergrößerung 1 : 7000

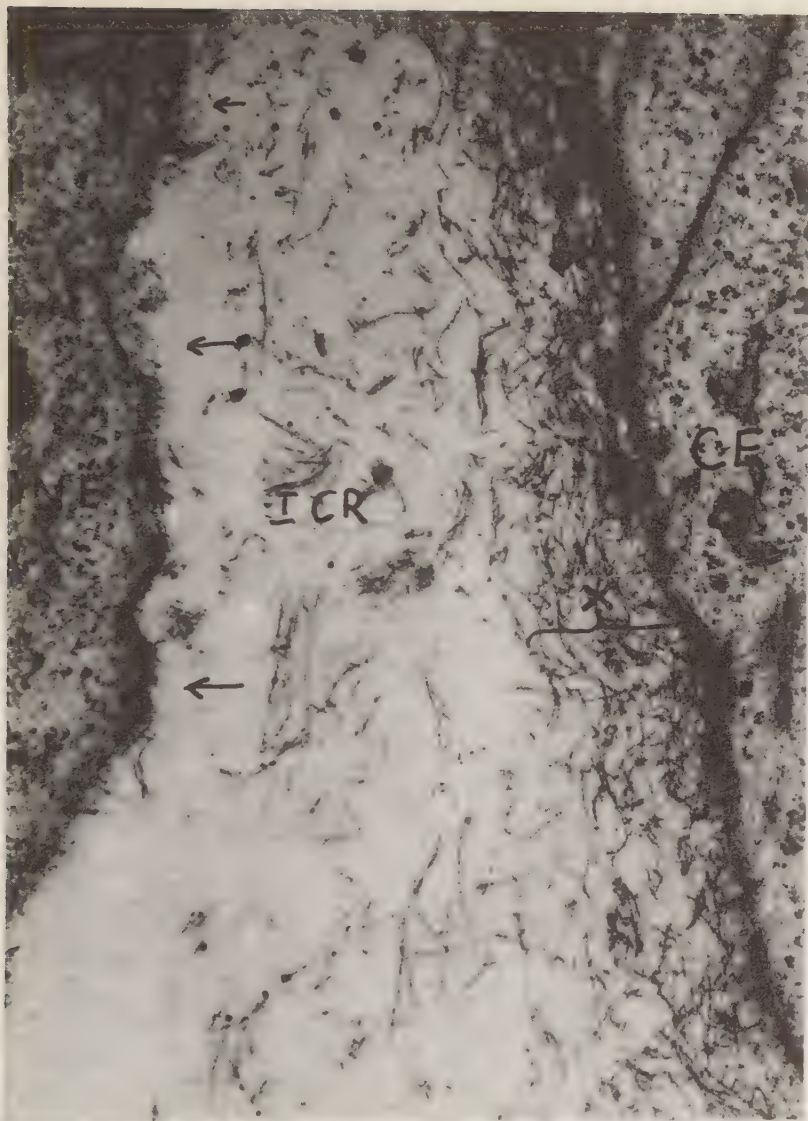


Abb. 4

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 30 Std. Interzellularraum (ICR) zwischen Neuralepithel (NE) und Chordaepithel (CE). Am Neuralepithel filamentäres und granulares Material = Beginn der Basalmembranbildung (↓). Um die Chorda filamentreiche Zone (X). Basalmembran (BM) wegen schrägen Anschnittes nicht deutlich dargestellt. Vergrößerung 1 : 35000

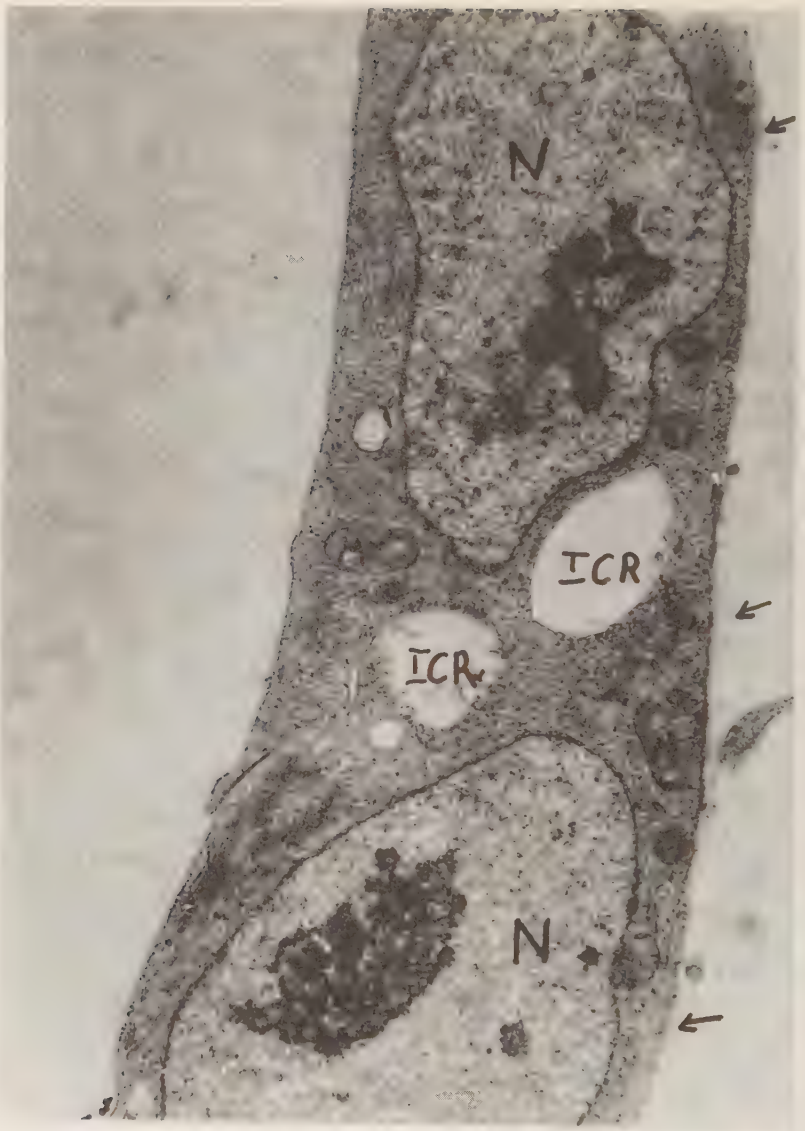


Abb. 5

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 18 Std. Einschichtiger Ektodermverband. Feinfadiges Material in Zellmembrannähe (1). ICR = Interzellularraum, M = Mitochondrien, N = Nukleus, NO = Nukleolus.

Vergrößerung 1 : 23000



Abb. 6

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 30 Std. Links oben im Bild Ektoderm kurz vor Schluß der Neuralrinne (E). Rechts unten Neurallepitheel (NE). An beiden Epithelgrenzen Plaques aus fädigem Material (↓) = Beginn der Basalmembranbildung. Im Interzellularraum feine Filamente von 40-60 Å mit unregelmäßigem Verlauf (X) und dickere Filamente von ca 120 Å mit angedeuteter Periodizität (O). M = Mitochondrien.

Vergrößerung 1 : 49000

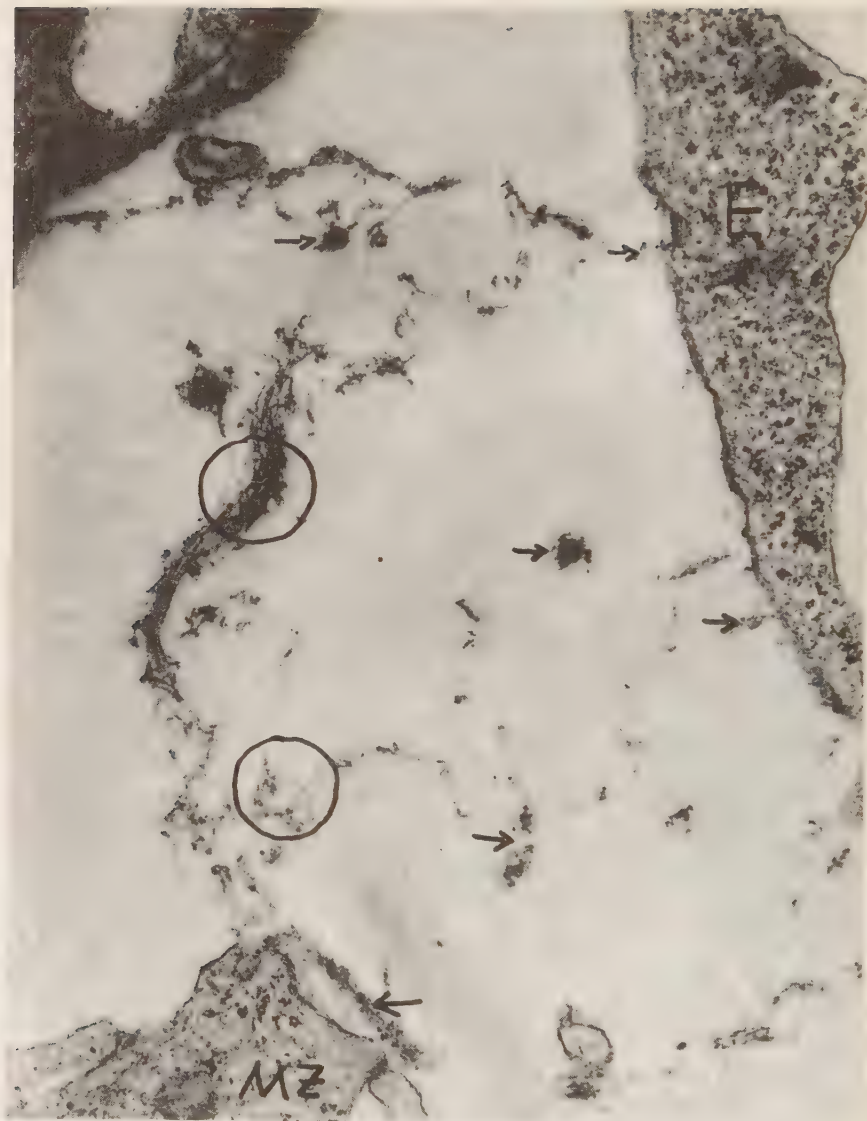


Abb. 7

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 30 Std. Bereich unter dem Ektoderm (E) in der Peripherie der Keimscheibe. Im Interzellularraum Plaques von elektronendichtem Material (↓) und unregelmäßig oder gebündelt verlaufende Filamente (○).  
 MZ = Mesenchymzellen.

Vergrößerung 1 : 49000

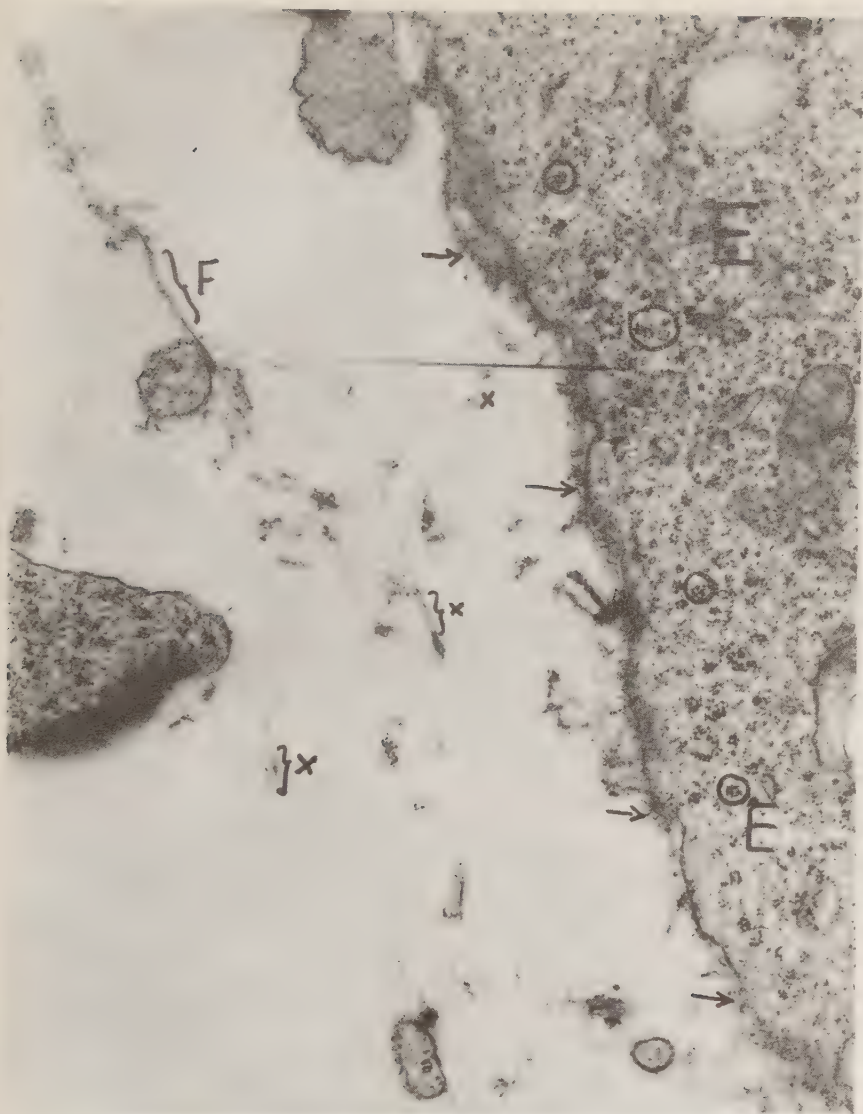


Abb. 8

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 30 Std. Bereich unter dem Ektoderm (E) medial von Abb.7 gelegen. Die Plaques von elektronendichtem Material fließen zu einer kontinuierlichen Basalmembran zusammen (↓). Im Interzellularraum einzelne oder zu zweit parallel verlaufende Filamente (X). Bei F angedeutete Periodizität. O = in Gruppen liegende freie Ribosomen (Polysomen).

Vergrößerung 1 : 49000

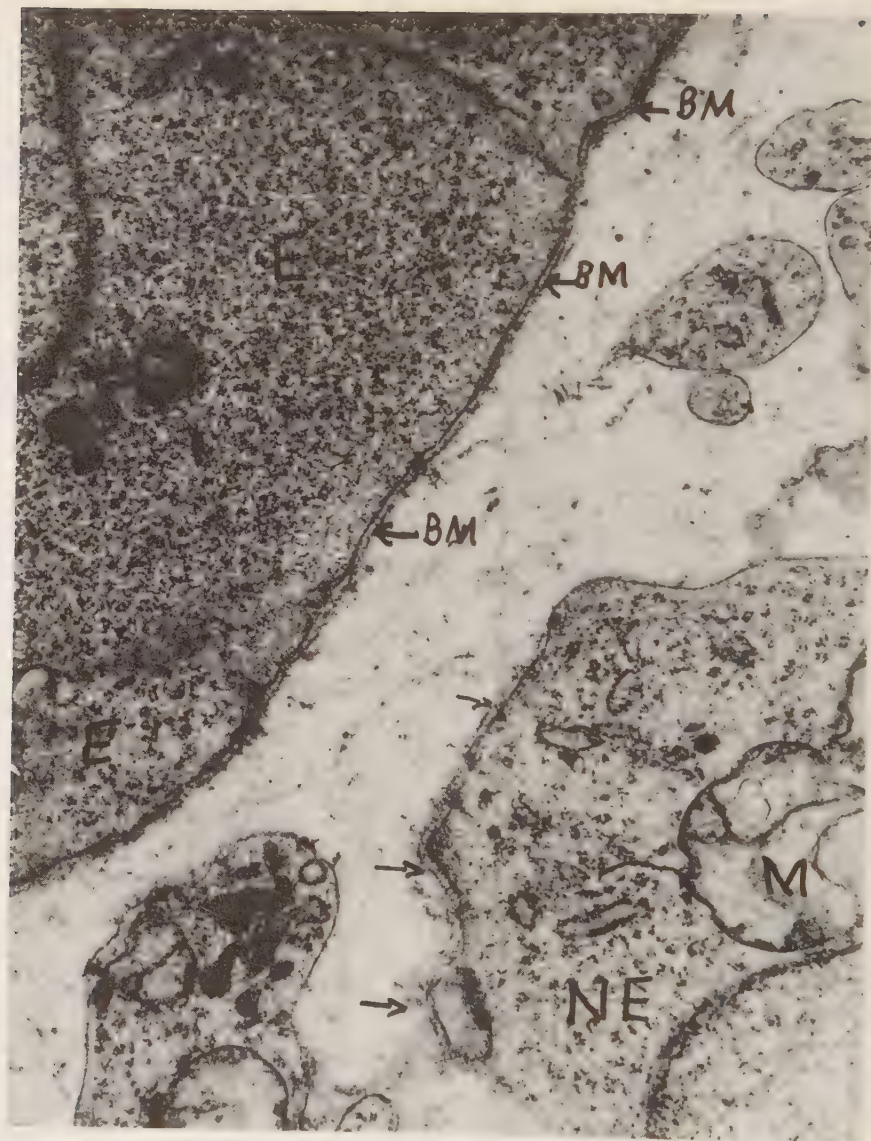


Abb. 9

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 36 Std. Ektoderm (E) an der Nahtstelle nach Abschnürung des Neuralrohres (NE). Unter dem Ektoderm eine kontinuierliche Basalmembran (BM). Beginn der Basalmembranbildung um das Neuralrohr (↓).  
M = Mitochondrien.

Vergrößerung 1 : 42000

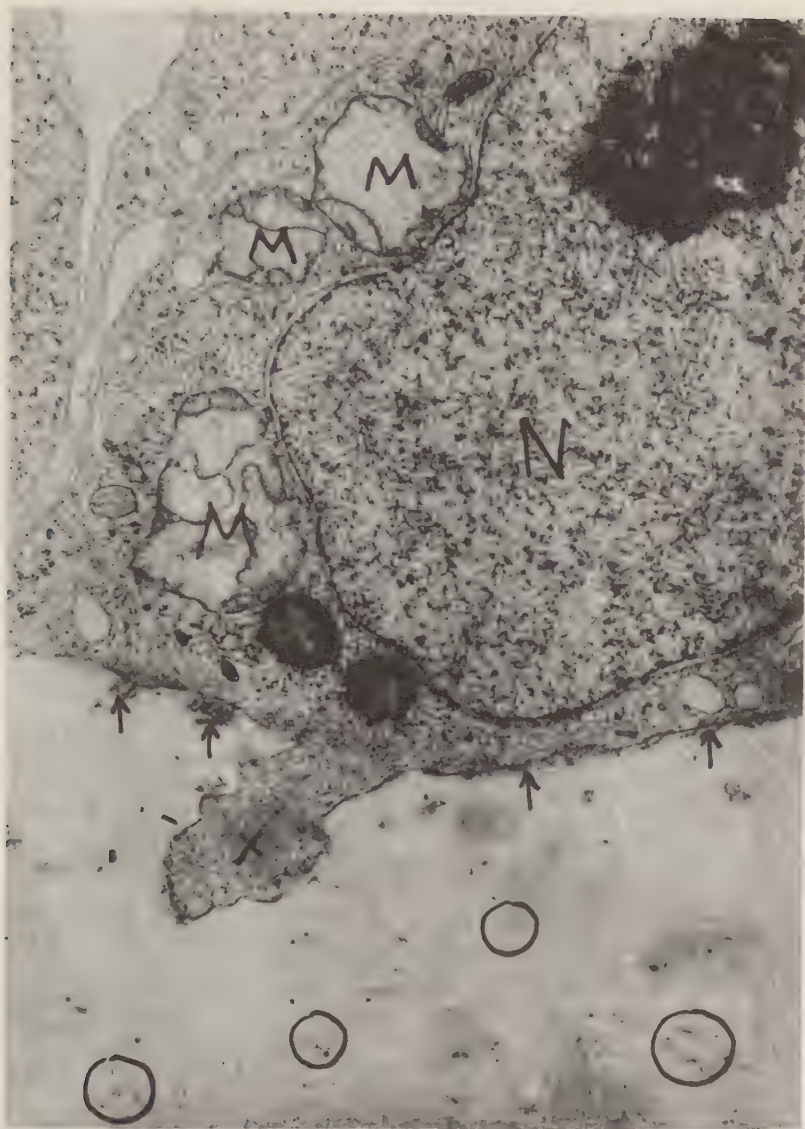


Abb. 10

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 36 Std. Basaler Teil einer Epithelzelle des WOLFFschen Ganges im Bereich des Wachstumskegels. Fortsätze in den umgebenden Interzellularraum (X). Plaques aus elektronendichtem Material an der Zellmembran (↓). O = einzelne oder gebündelt verlaufende Filamente  
 N = Nukleus, NO = Nukleolus, M = Mitochondrien.

Vergrößerung 1 : 35000

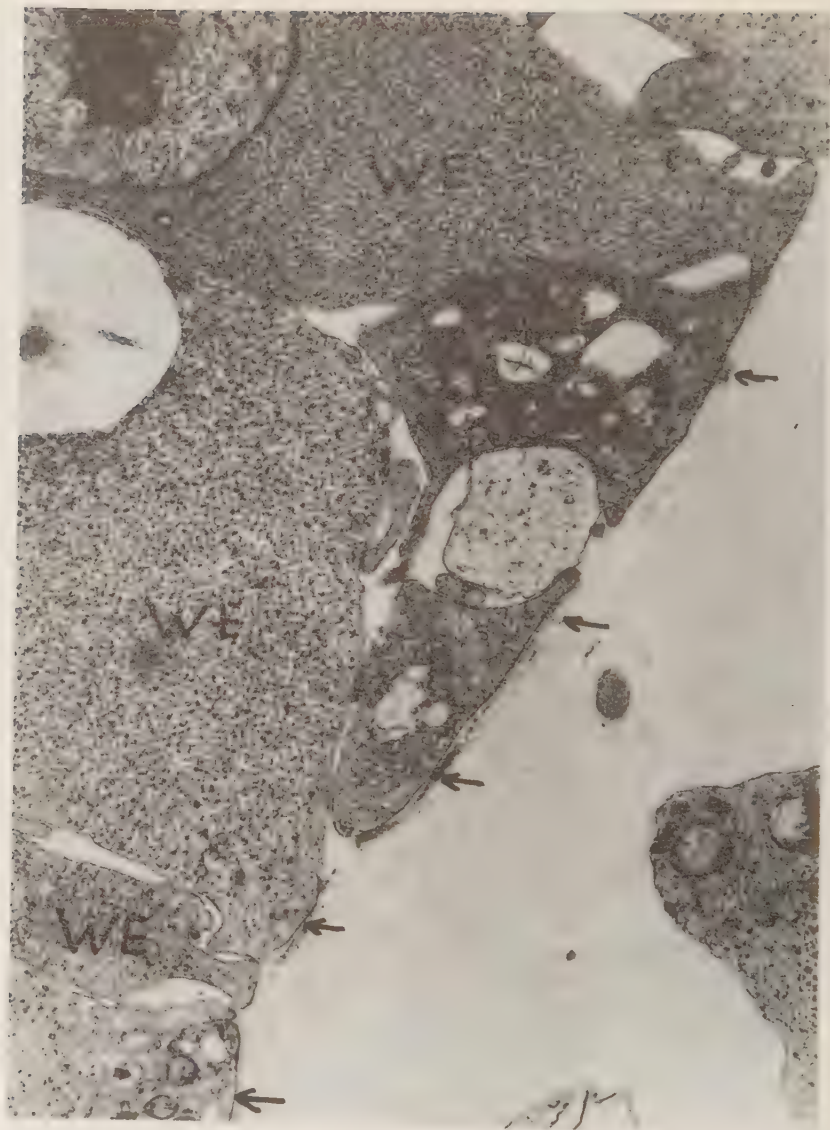


Abb. 11

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 36 Std. Basaler Teil von Epithelzellen des WOLFFschen Ganges im Bereich des Wachstumskegels. Plaques aus elektronendichtem Material (↓) = Beginn der Basalmembranbildung. Epithelzellen des WOLFFschen Ganges (WE) ausgefüllt mit freien Ribosomen.

Vergrößerung 1 : 21000

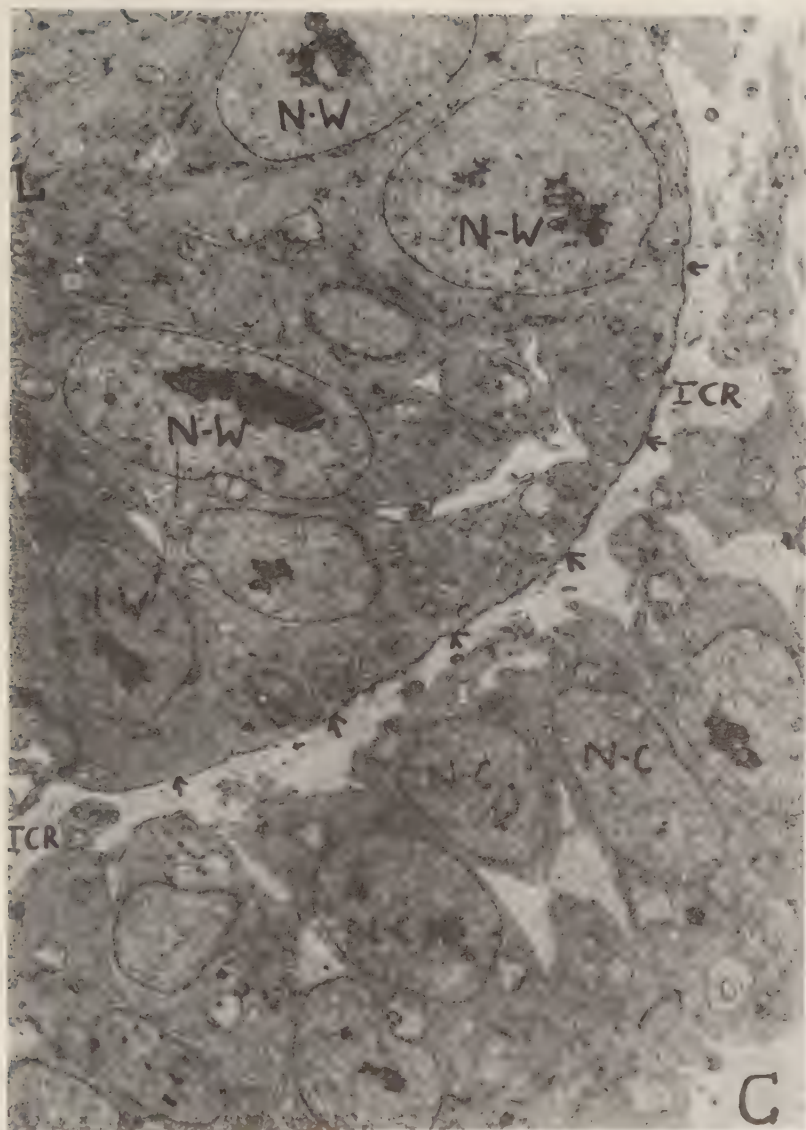


Abb. 12

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 36 Std. Schnitt durch den WOLFFschen Gang oberhalb des Wachstumskegels mit einer kontinuierlichen Basalmembran (↓). Im Interzellularraum (ICR) Filamente. NW = Kerne der Epithelzellen des WOLFFschen Ganges, L = Lumen des WOLFFschen Ganges, NC = Kerne des Coelomepithels, C = Coelomhöhle. Keine Basalmembran unter dem Coelomepithel.

Vergrößerung 1 : 7000

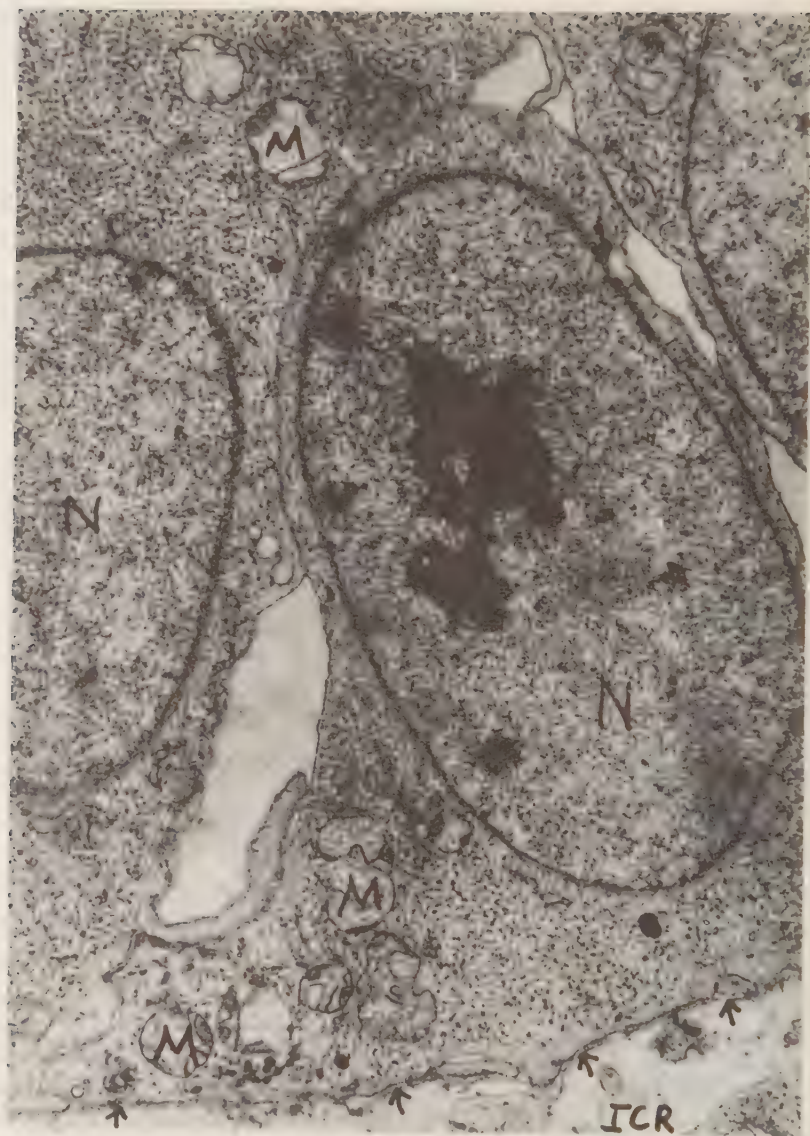


Abb. 13

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 36 Std. Schnitt durch den WOLFFschen Gang oberhalb des Wachstumskegels mit einer kontinuierlichen Basalmembran (↓). Im Interzellularraum (ICR) einzelne Filamente. N = Nukleus, No = Nukleolus, M = Mitochondrien.

Vergrößerung 1 : 21000

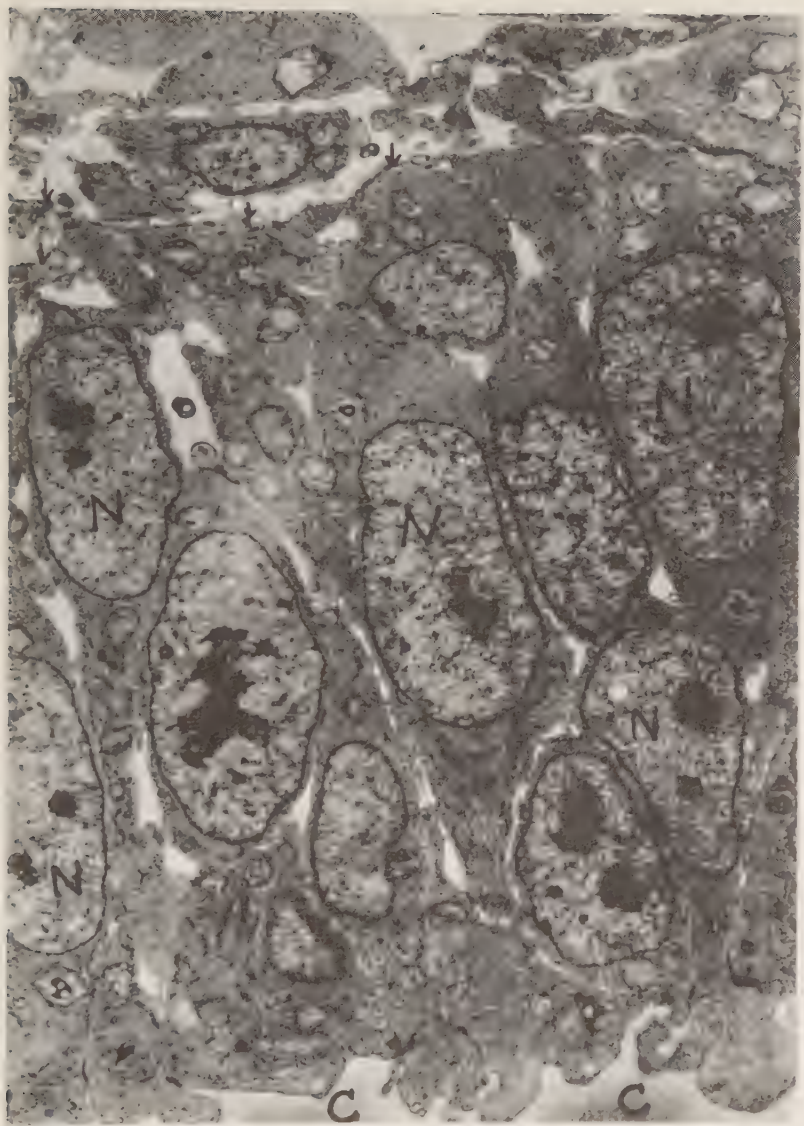


Abb. 14

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 42 Std. Mehrreihiges Coelomepithel. Beginn der Basalmembranbildung (↓).  
C = Coelomhöhle, N = Kerne des Coelomepithels.

Vergrößerung 1 : 7000

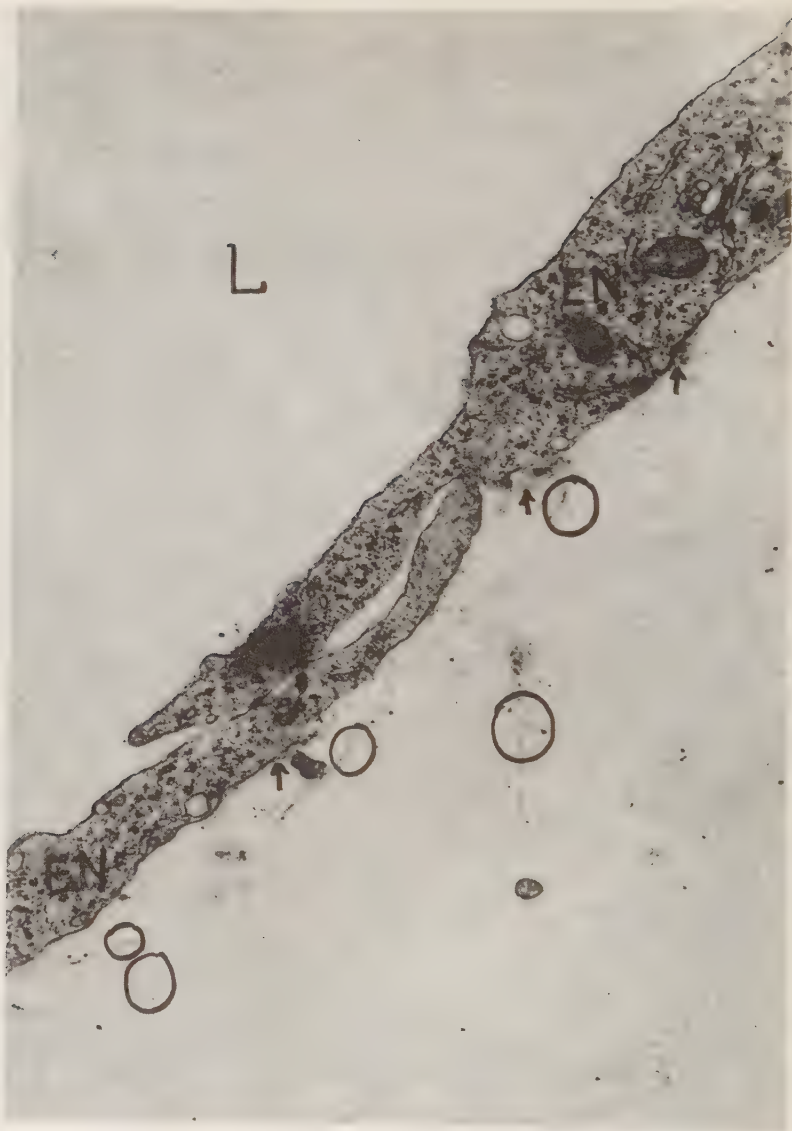


Abb. 15

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 42 Std. Endothel  
 des Herzschlauches (EN) mit Beginn der Basalmembranbildung  
 (↓). O = Filamente im Interzellularraum, L = Gefäßlumen.  
 Vergrößerung 1 : 35000

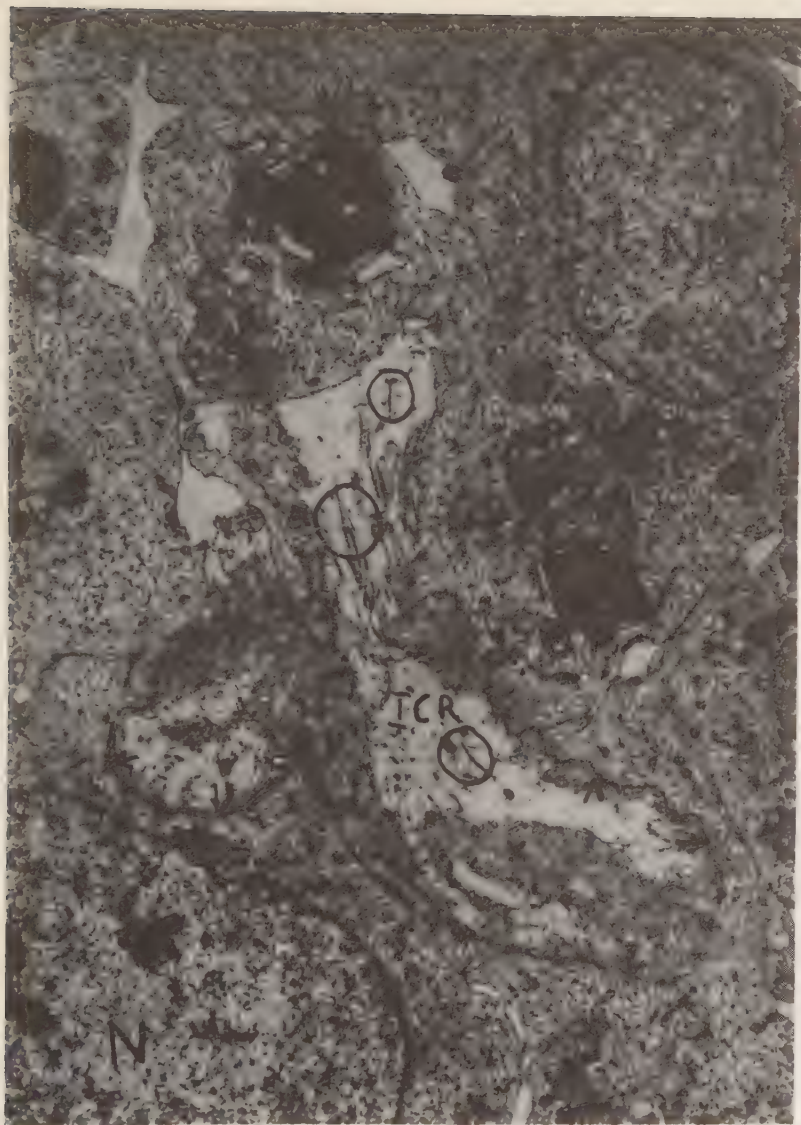


Abb. 16

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 48 Std. Zellen aus der Leberanlage. Im Interzellularraum (ICR) Basalmembranbildung (↓), angedeutete filamentäre Substanzen (X) und dicke Filamente (O). N = Nukleus. Vergrößerung 1 : 21000

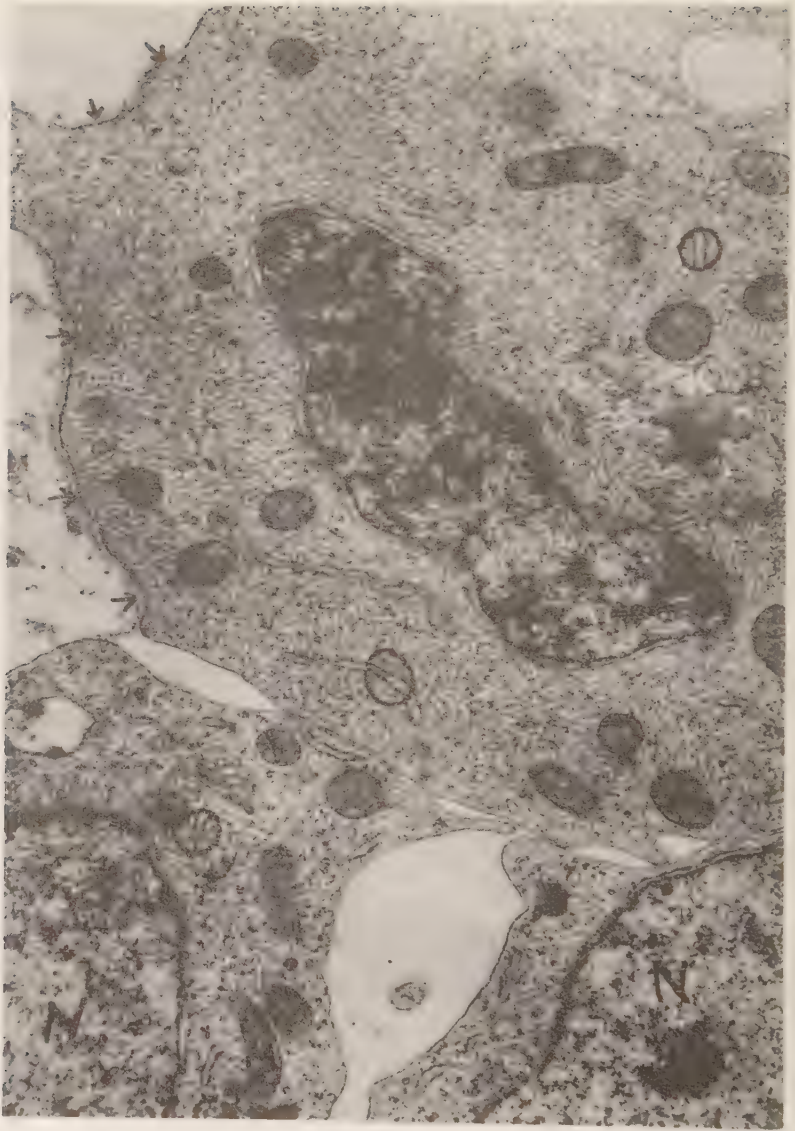


Abb. 17

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 66 Std. Beginn der Basalmembranbildung (!) um eine epitheliale Knospe im mesonephrogenen Blastem. N = Nukleus, M = Mitochondrien, O = freie Ribosomen und Hohlräume des rauhen eR.

Vergrößerung 1 : 28000

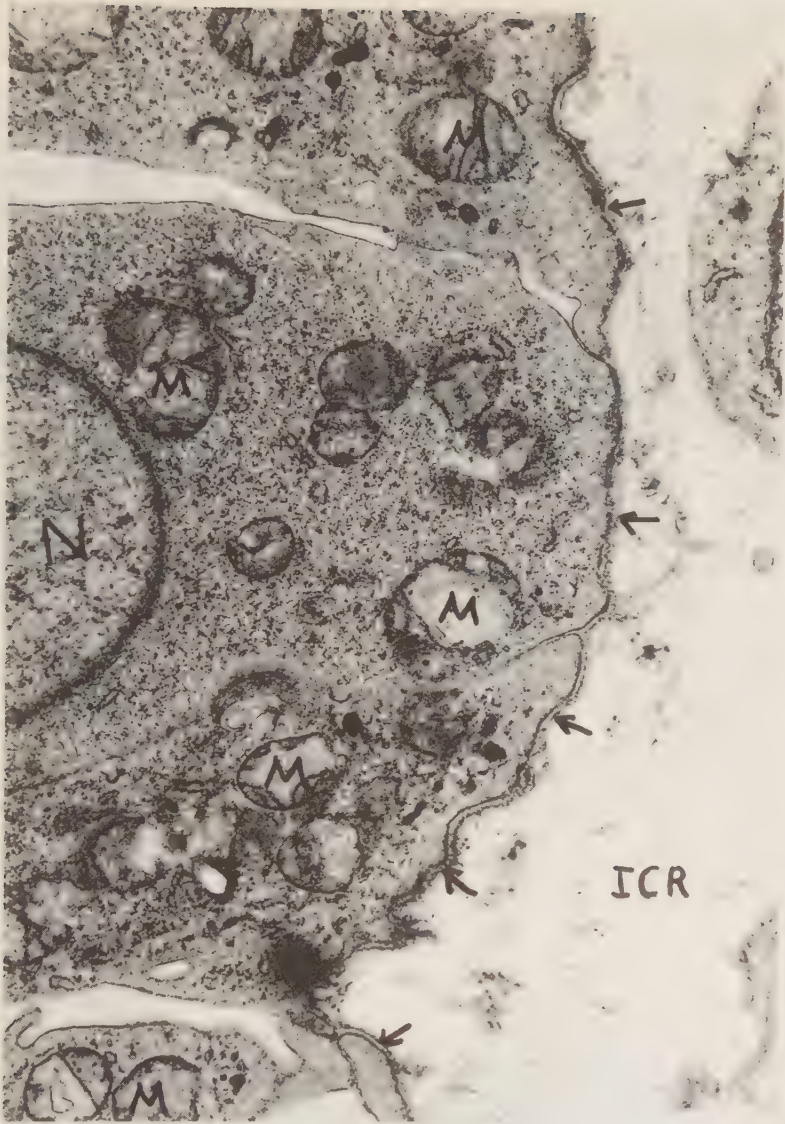
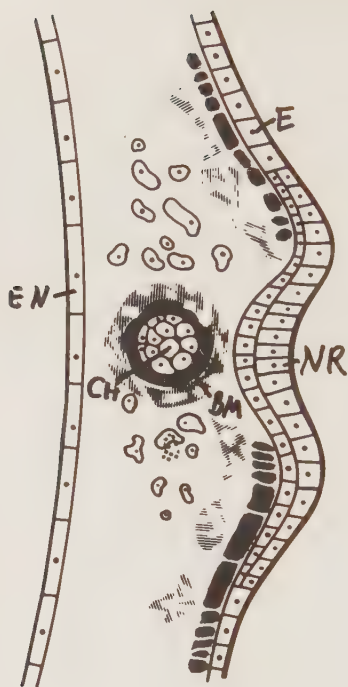


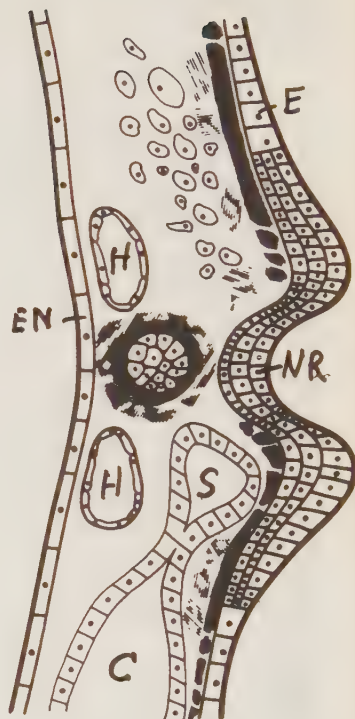
Abb. 18

Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 66 Std. Kontinuierliche Basalmembran (↓) um einen Epitheltubulus im mesonephrogenen Blastem. Im Interzellularraum (ICR) Filamente. N = Nukleus, M = Mitochondrien. Vergrößerung 1 : 28000



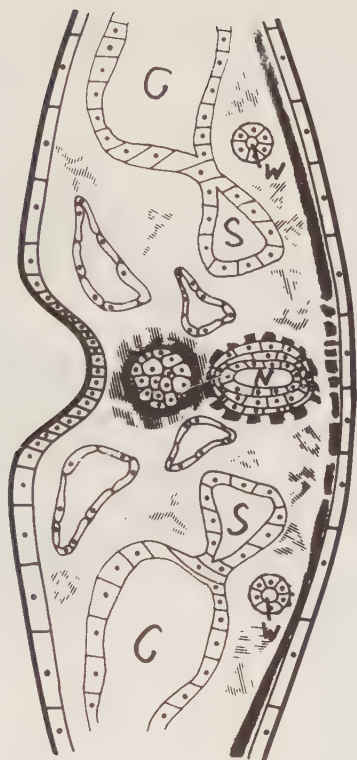
Schema 1

Querschnitt durch ein Hühnerembryo nach einer Bebrütungsdauer von 24 Std. Nichtkontinuierliche Basalmembran unter dem Ektoderm, kontinuierliche BM um die Chorda. In diesen Bezirken auch Filamente. Graue, kleinkarierte Flächen = Basalmembran = Filamente. E = Ektoderm, EN = Entoderm, CH = Chorda, NR = Neuralrinne.



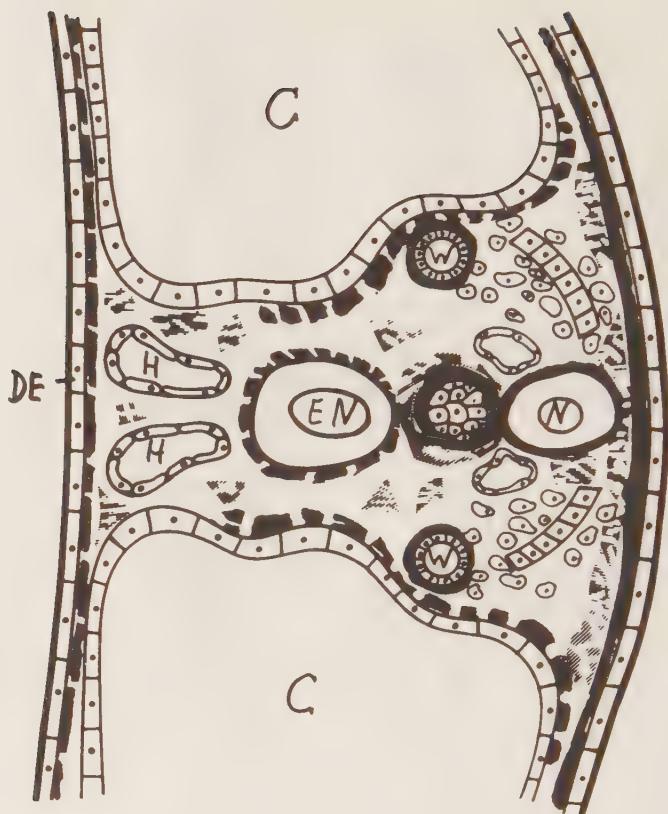
Schema 2

Bebrütungsdauer von 36 Std. Streckenweise kontinuierliche Basalmembran unter dem Ektoderm. Sonst wie Schema 1. Beginn der Bildung von Somiten und Coelomhöhle. Neuralrohr tief gefaltet. Beschriftung siehe Schema 1.



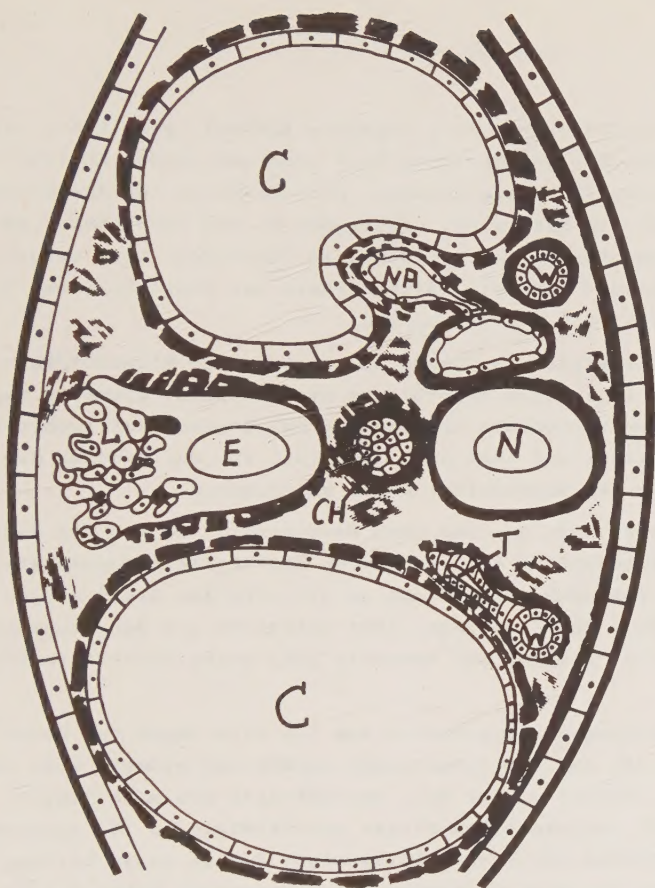
### Schema 3

Bebrütungsdauer 42 Std. Fast kontinuierliche Basalmembran unter dem Ektoderm. Beginn der BM-Bildung um das abgelöste Neuralrohr (N) und streckenweise um die WOLFFschen Gänge (W). Filamente unter dem Ektoderm, um die Chorda, aber auch an anderen Stellen. S = Somit, C = Coelomhöhle.



Schema 4

Bebrütungsdauer von 60 Std.  
 Kontinuierliche Basalmembran unter  
 dem Ektoderm (E), um die Chorda(CH)  
 um das Neuralrohr (N) und die obe-  
 ren Abschnitte des WOLFFschen Gan-  
 ges (W). Nichtkontinuierliche Ba-  
 salmembran um das Entoderm (EN)  
 und die Coelomhöhle (C). Filamente  
 an vielen Stellen. DE = Dottersack-  
 epithel, H = Herzanlage.



Schema 5

Bebrütungsdauer von 72 Std.  
 Basalmembranen unter dem Ektoderm,  
 um Chorda (CH), Neuralrohr (N),  
 WOLFFschen Gang (W), Tubuli (T)  
 der Nierenanlage, Aortenäste zur  
 Nierenanlage (NA). Nicht-kontinu-  
 ierliche Basalmembran um das Ento-  
 dermrohr (E) und die Coelomhöhle  
 (C). L = Leberanlage. Filamente an  
 vielen Stellen.

## Lebenslauf

Am 15.2.1928 wurde ich, Ingeborg Klöppel, geb. Lanz, als Tochter des Diplomingenieurs Kurt Lanz und seiner Ehefrau Olga, geb. Pohler, in Danzig geboren. Hier besuchte ich die Grundschule und von meinem 10. Lebensjahr an die Oberschule. Nach Aussiedlung kam ich nach Ilmenau in Thüringen. Dort besuchte ich von 1946 - 1947 die letzte Klasse der Oberschule und schloß im Juni 1947 mit dem Abitur ab.

Nach Tätigkeit als "Oberschulhelferin" in Eisenach/Thür. wurde ich 1951 wegen Überfüllung des Medizinstudiums an der Technischen Hochschule Dresden für das Studium der Architektur immatrikuliert und ließ mich aber 1952 für das Studium der Medizin an der Universität Halle umschreiben.

Im Herbst 1952 kam ich nach West-Berlin, wo ich das begonnene Medizinstudium an der "Freien Universität" fortsetzte, 1955 das Physikum ablegte und am 4.4.1960 das Staatsexamen mit der Note "gut" bestand. 1961 heiratete ich den Zahnarzt Dr.Karl-Otto Klöppel und beendete 1963 meine Medizinalassistentenzeit.

Nach erlangter Approbation zog ich mich wegen der Geburt eines Kindes aus dem Berufsleben zurück und widmete mich meiner Familie. Während dieser Zeit beschäftigte ich mich jedoch weiter mit medizinischen Fragen und fertigte am II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin unter Leitung von Herrn Priv.Doiz.Dr.H.J. Merker die vorliegende Doktorarbeit an.



